

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**A FREQUÊNCIA DE CÂNCER NA DOENÇA DE MACHADO JOSEPH**

Gabriele Nunes Souza

**Porto Alegre**

**2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**A FREQUÊNCIA DE CÂNCER NA DOENÇA DE MACHADO JOSEPH**

Gabriele Nunes Souza

Orientador: Prof. Dra. Laura Bannach Jardim  
Co-orientador: Dr Jonas Alex Morales Saute

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre  
2015

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Marcos e Suzete por estarem sempre presentes e me incentivando no crescimento profissional e pessoal. Com carinho.

Agradeço especialmente minha mãe Suzete quem nunca não mediu esforços para me proporcionar uma boa educação e me ajudar nos momentos mais difíceis. Com amor e carinho.

À minha irmã Cecília Nunes, que sempre me incentivou, com suas críticas construtivas. Com carinho.

Aos pacientes e suas famílias, por participarem e por motivarem a realização deste estudo.

À Prof. Dra. Laura Jardim pela orientação, por seus ensinamentos, paciência, disponibilidade e incentivo durante estes anos. Com admiração.

Ao Dr. Jonas Saute por seus ensinamentos, contribuição, disponibilidade e incentivo. Com admiração.

Às pessoas que colaboraram e que tornaram possível a realização deste trabalho em suas diversas etapas: Daphne Pacheco, Thomaz Gonçalves em especial a Nathália Kersting, por sempre me incentivar, acompanhar em todo o processo do estudo. Com carinho.

Ao Núcleo de Informação em Saúde, em especial a Barbára Rejane da Cruz, por sua disponibilidade e auxílio na coleta dos dados do SIM.

Às pessoas da sala de Pesquisa do CPC, Débora e Sirlei pela paciência, incentivo e companheirismo em entender horas e horas ao telefone nas entrevistas. Com carinho.

Ao Alder Henrique pelo incentivo, carinho, companheirismo, paciência quem me acompanhou em toda a jornada. Com amor.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Prof. Dr. Rafael Roesler

Prof. Dra. Bárbara Niegia Garcia de Goulart

## RESUMO

**Introdução:** A doença de Machado-Joseph, também conhecida como ataxia espinocerebelar tipo 3 (DMJ/SCA3), é de início na vida adulta, uma doença neurodegenerativa autossômica dominante causada por uma expansão CAG no gene *ATXN3*. A DMJ/SCA3 pertence ao grupo de doenças chamado de poliglutaminopatias (PoliQ). A redução do risco de câncer em indivíduos com PolyQ tais como a doença de Huntington foi previamente relatada em uma população diferente. Nenhum estudo buscando essa associação em DMJ/SCA3 já foi realizada. **Objetivos:** comparar os 15 anos de incidência cumulativa de câncer (*ICC*) e a proporção de câncer como causa de morte em portadores de DMJ/SCA3 sintomáticos observados e nos controles. **Métodos:** Indivíduos com DMJ/SCA3 pertencentes ao Rio Grande do Sul em uma coorte de 2000 a 2015 foram identificados. Entrevistas estruturadas foram feitas com indivíduos afetados e com controles não relacionados. A CIC conforme publicado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), do Brasil, foi usado como um controle populacional. As causas de morte entre as famílias com DMJ/SCA3 e controles não relacionados pareados também foram obtidos pelo Sistema de Informações sobre Mortalidade Pública. Foram entrevistados 154 pacientes com DMJ/SCA3 e 80 controles não relacionados. **Resultados:** A CIC foi de 7/154 (4,5%) e 5/80 (6,3%) entre DMJ/SCA3 e nos indivíduos controles não relacionados, respectivamente. Para obter uma redução do risco absoluto de 1,8 entre os casos e controles, seriam necessários 1.938 indivíduos por grupo para detectar uma diferença significativa entre os grupos. A população total de sintomáticos com DMJ/SCA3 igualou-se a 625 indivíduos em 2015, esse estudo foi interrompido. O câncer foi a causa da morte em 9/101 (8,9%) DMJ/SCA3 e em 52/202 (26,2%) controles, com uma redução do risco absoluto de 17,3% no grupo DMJ/SCA3 ( $\chi^2 = 12,421$ ;  $p = 0,001$ ; OR 0,27, IC 95% 0,13-0,58). Indivíduos com DMJ/SCA3 que morreram de câncer eram mais velhos e tinham uma menor *CAGexp* que os casos que faleceram de outras causas. **Discussão:** Devido à raridade da DMJ/SCA3, estudos de CIC em indivíduos vivos com poder estatístico são inviáveis. No entanto, uma redução significativa de câncer como uma causa de morte foi detectada em DMJ/SCA3. Estes dados confirmam a associação de polyQ com proteção contra o câncer e sugerem que polyQ de fato são doenças de multissistemas.

**Palavras- Chaves:** Doença de Machado Joseph, Câncer, Poliglutaminopatias, Ataxia Espinocerebelar do tipo 3.

## ABSTRACT

**Introduction:** Machado-Joseph disease, also known as Spinocerebellar Ataxia type 3 (MJD/SCA3), is an adult-onset autosomal dominant neurodegenerative disease caused by an expanded CAG repeat in the ATXN3 gene. MJD/SCA3 belongs to the so-called group of polyglutamine disorders (PolyQ). Reduced risk of cancer in individuals with PolyQ such as Huntington disease was previously reported in different population. No study searching for this association in MJD/SCA3 was already performed. **Objectives:** We aimed to compare the 15 years cumulative incidence of cancer (ICC) and the proportion of cancer as a cause of death in symptomatic SCA3/MJD carriers with those observed in controls. **Methods:** SCA3/MJD individuals belonging to the Rio Grande do Sul cohort from 2000 to 2015 were identified. A structured interview was done with affected individuals and with unrelated controls. CIC as published by the National Institute of Cancer (INCA), Brazil, was used as a population control. Causes of death among SCA3/MJD families and paired unrelated controls were also obtained from the Public Information System on Mortality. **Results:** 154 SCA3/MJD patients and 80 unrelated controls were interviewed. CIC were 7/154 (4.5%) and 5/80 (6.3%) among SCA3/MJD and unrelated control individuals, respectively. For an absolute risk reduction of 1.8 between cases and controls, 1,938 individuals per group would be needed to detect a significant difference between groups. Since the total symptomatic SCA3/MJD population equaled 625 individuals in 2015, this study was interrupted. Cancer was a cause of death in 9/101 (8.9%) SCA3/MJD and in 52/202 (26.2%) controls, with an absolute reduction risk of 17.3% in the SCA3/MJD group ( $\chi^2=12.421$ ;  $p=0.001$ ; OR 0.27, IC95% 0.13 to 0.58). SCA3/MJD individuals who died from cancer were older and carried shorter CAGexp than those SCA3/MJD cases who died from other causes. **Discussion:** Due to the rarity of SCA3/MJD, CIC studies in living individuals with statistical power are unfeasible. However, a significant reduction of cancer as a cause of death was detected in SCA3/MJD. This data confirm the association of PolyQ with protection against cancer and suggest that PolyQ are indeed multisystem disorders.

**Key-words:** Machado Joseph Disease, Cancer, Polyglutamine (Poly(Q)), Spinocerebellar ataxia type 3.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DMJ	Doença de Machado-Joseph
SCA3	Ataxia Espinocerebelar do tipo 3
SCA	Ataxia espinocerebelar
CAGexp	CAG expandida
PoliQ	Poliglutaminopatias
poliQ	Poliglutaminas expandida
HA	Ataxia hereditária
DH	Doença de Huntington
DA	Doença de Alzheimer
DRPLA	Atrofia dentato-rubro-palido-luisiana
SBMA	Atrofia muscular espinhal e bulbar
SCA1	Ataxia espinocerebelar do tipo 1
ATXN3	Proteína ataxina-3
CAG	Glutamina
SNC	Sistema Nervoso Central
UPS	Sistema ubiquitina-proteassoma
NI	Neuroinclusões ou agregados intranucleares neuronais
UIM	Motivos de interação com a ubiquitina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
SIM	Sistema de Informação Sobre Mortalidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	11
2.2 Doença de Machado-Joseph (DMJ)/ Ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3) .....	13
2.2.1 Conceito .....	13
2.2.2 Contexto Histórico .....	13
2.2.3 Contexto Epidemiológico .....	15
2.2.4 Manifestações clínicas .....	15
2.2.5 Aspectos moleculares e fisiopatologia .....	16
2.2.6 Aspectos evolutivos – seleção natural e pleiotropismo antagonístico .....	18
2.3 Câncer .....	19
2.4 O câncer nas Poliglutaminopatias .....	21
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Objetivo geral .....	24
4.2 Objetivos específicos .....	24
<b>REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
<b>5 ARTIGO CIENTIFICO EM INGLÊS .....</b>	<b>30</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>46</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO A- Protocolo de Pesquisa - Câncer na Doença de Machado Joseph .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CASOS .....</b>	<b>54</b>
<b>.ANEXO C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	
<b>CONTROLES.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO D- ROTEIRO DA ENTREVISTA POR TELEFONE.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO E- Spinocerebellar ataxia tupe 3/Machado-Joseph disease: segregation</b>	
<b>patterns and epidemiological factors influencing CAG instability to be submitted</b>	
<b>Clinical Genetics.....</b>	<b>61</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Machado-Joseph (DMJ), também conhecida como ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3), é uma doença autossômica dominante, causada por uma expansão da repetição CAG (CAG<sub>exp</sub>) no gene ATXN3 (TAKIYAMA et al 1993; KAWAGUCHI et al 1994). O nome “Machado-Joseph” faz alusão ao nome das duas primeiras famílias, descendentes de portugueses açorianos, nas quais foram descritas pela primeira vez os sintomas da doença na década de 70 (BETTENCOURT et al., 2011)

A DMJ/SCA3 é a forma mais comum de ataxia dominante em todo mundo (SEQUEIROS et al. 2012). Ela atinge a maior frequência relativa no Estado do Rio Grande do Sul (RS), onde representa 78% de todas as SCAs (CASTILHOS et al, 2013). Um efeito fundador açoriano, ocorrido a partir de 1751 quando foi iniciada a emigração de açorianos para o Sul do Brasil, é considerado como a principal razão para o elevado número de casos nesta região. Esta explicação histórica foi recentemente reforçada por Camargo e colaboradores ao descreverem frequências regionais elevadas no RS, compatíveis com um efeito fundador, (CARMAGO 2011). O estudo estimou a prevalência da DMJ/SCA3 em diferentes municípios do Estado. As cidades de General Câmara (106:100.000), Palmitinho (86,7:100.000), São Jerônimo (49,8:100.000) e São Pedro do Sul (42,7:100.000) (Camargo, 2011) foram as localidades com maior prevalência.

A idade de início dos sintomas em brasileiros é em média de 32-36 anos (JARDIM et al, 2001a; TROTT et al, 2006) e o tempo de sobrevida após o início dos sintomas, de 21 anos em média (KIELING et al, 2007). Idades de início precoce e expansões CAG mais longas são preditores de menor sobrevida (KIELING et al, 2007).

Entre os achados clínicos da DMJ/SCA3 destacam-se ataxia de marcha e de membros, disartria, diplopia e disfagia; sinais e sintomas decorrentes da degeneração progressiva do cerebelo e de suas vias aferentes e eferentes (SAUTE & JARDIM 2015). Embora não haja tratamentos modificadores da doença, alguns tratamentos sintomáticos farmacológicos ou de reabilitação são disponíveis. A literatura é muito escassa na descrição das principais causas de morte e possíveis comorbidades relacionadas a DMJ/SCA3.

A presença de uma CAGexp está associada à expressão de uma cadeia excessivamente longa de poliglutaminas (poliQ) na proteína codificada, chamada ataxina-3 (COSTA & PAULSON, 2012). Além da DMJ/SCA3, as SCAs 1, 2, 6, 7, 17 e DRPLA, a doença de Huntington (DH) e a atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA) compartilham do mesmo mecanismo de mutação e muitos dos processo patogênicos, fazendo parte do grupo denominado de poliglutaminopatias (PoliQ) (DÜRR, 2010; COSTA & PAULSON, 2012).

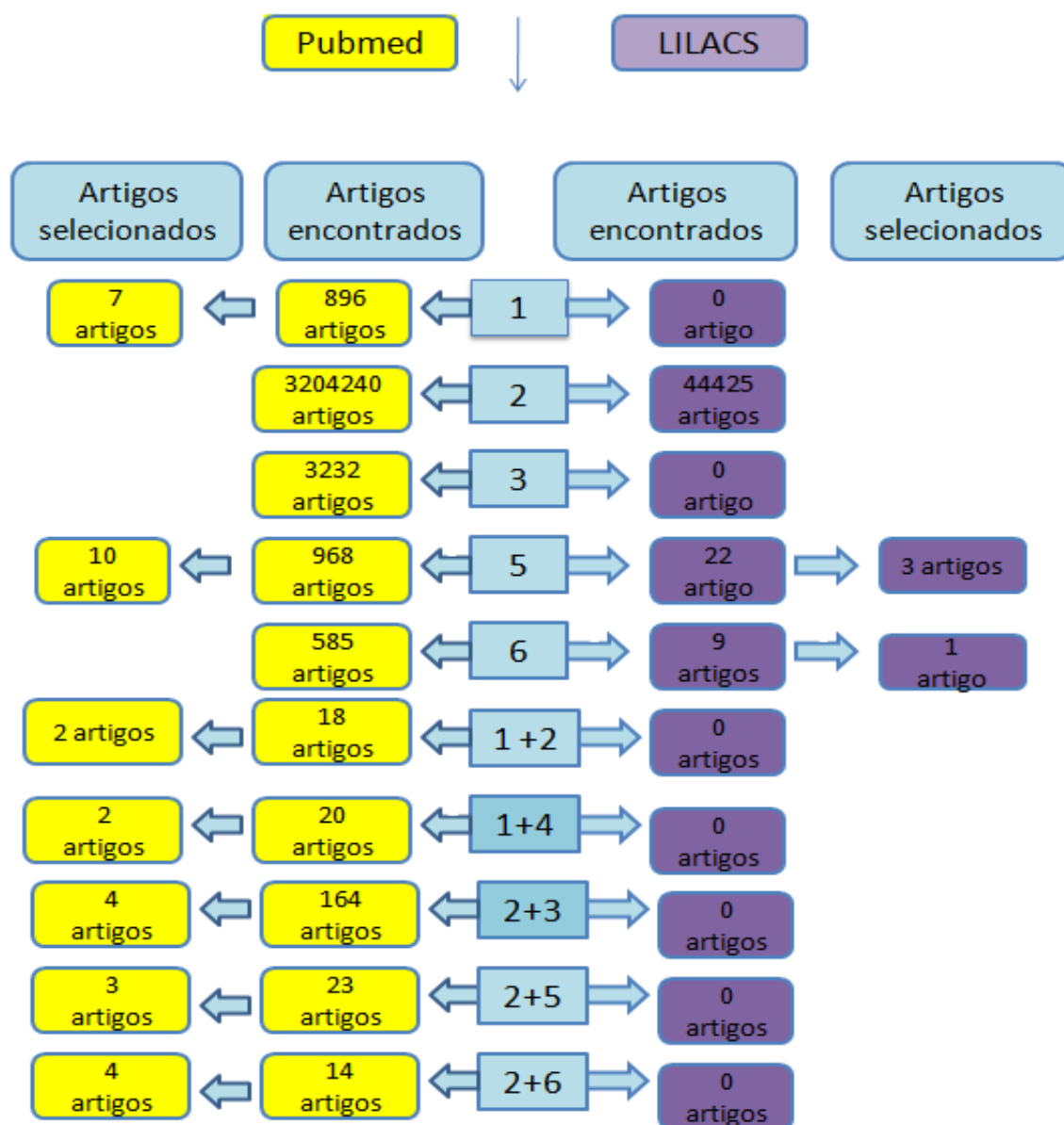
Estudos epidemiológicos nas populações sueca, dinamarquesa e britânica relataram que as PoliQ poderiam estar relacionados a um menor risco de desenvolver câncer - principalmente na doença de Huntington (SORENSEN et al1999; JI et al2012; TURNER et al2013). Estudos focados em SCA3/DMJ ainda não foram realizados. A hipótese seria que a presença de poliQ intracelulares poderia ter um efeito protetor à oncogênese por mecanismos celulares ainda não bem esclarecidos.

Frente a esse panorama, o presente estudo pretende levantar evidências em favor da hipótese de que os pacientes com a DMJ/SCA3 teriam um reduzido risco de desenvolver alguma neoplasia ao longo da vida.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A presente revisão da literatura seguiu uma estratégia de busca ilustrada pelo fluxograma abaixo. A busca envolveu as seguintes bases de dados: *LILACS*, *PubMed*. Artigos, teses e monografias foram incluídas do período de 1990 a 2015, publicadas em português e inglês. Foram utilizadas palavras-chaves: “*Machado Joseph disease*”, “*câncer*”, “*Poliglutamine disease*”, “*causes of death*”, “*spinocerebellar ataxia type 3*” e “*SCA3*” e suas combinações apresentadas na Figura 1. Referências dos artigos selecionados que continham informações pertinentes ao estudo também foram incluídas.



### Legenda

- 1- "Machado Joseph Disease"
- 2- "Câncer"
- 3- "Polyglutamine (Poly(Q))"
- 4- "Causes of Death"
- 5- "Spinocerebellar ataxia type 3"
- 6- "SCA3"

**Figura 1.** Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo, bem como artigos citados na revisão literatura de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos pelo autor. Elaborado pela autora (2015).

## 2.2 Doença de Machado-Joseph (DMJ)/ Ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3)

### 2.2.1 Conceito

A Doença de Machado-Joseph, também chamada de ataxia espinocerebelar do tipo 3 (DMJ/SCA3) é uma doença genética com herança autossômica dominante. Com início na vida adulta, a DMJ/SCA3 caracteriza-se por uma ataxia progressiva que envolve a marcha e os movimentos das extremidades e da faringe, associada a diferentes outras manifestações neurológicas causadas por uma degeneração progressiva de diversas vias e núcleos neuronais do Sistema Nervoso Central (SNC) (KIELING et al, 2007). A DMJ/SCA3 é causada pela expansão de uma sequência repetitiva CAG (CAGexp) na matriz de leitura de um dos alelos de seu gene codificante *ATXN3*, localizado no cromossomo 14q32. Uma CAGexp em heterozigose é suficiente para causar a condição, que por ser autossômica dominante e ocorrer após a idade fértil, acomete muitos sujeitos em uma dada família. O exame molecular que confirma a expansão da sequência de códons CAG (CAGexp) é o padrão-ouro para o diagnóstico da doença (PAULSON, 2011).

### 2.2.2 Contexto Histórico

A primeira descrição foi feita há mais de 40 anos a partir de uma família norte-americana (Massachusetts, EUA) de origem açoriana (descendentes de William Machado, nativo da Ilha de São Miguel), na qual segregava uma forma de ataxia progressiva com herança dominante. Nesta mesma época foi relatada outra família de origem açoriana que vivia também no Estado de Massachusetts e que apresentava sintomas semelhantes aos descritos por Nakano et al. (1972). Essa família foi identificada como família Thomas (WOODS & SCHAUMBURG, 1972).

Em 1976, Rosenberg e colaboradores descreveram uma família de origem açoriana na costa oeste dos Estados Unidos, de sobrenome Joseph, que apresentava ataxia progressiva com herança dominante (ROSENBERG et al., 1976). Primeiramente, pela diferença fenotípica relacionada à heterogeneidade dos sintomas clínicos, os

pesquisadores acreditavam se tratar de doenças distintas. Porém, quando Romanul et al. descreveram em 1977, mais uma família da mesma localidade (Massachusetts) de mesma origem (açoriana) com uma doença que reunia as diferentes características sintomatológicas das três famílias anteriores concluíram que se tratava da mesma doença, porém com expressividade clínica variável e a denominaram de “doença açoriana” (ROMANUL et al., 1997).

Pesquisadores portugueses identificaram em 1980 a primeira família não relacionada à Ilha dos Açores ou com a América do Norte na qual alguns indivíduos apresentavam os sintomas da “doença açoriana”. Então, em 1980, Coutinho & Sequeiros propuseram a denominação de “Doença de Machado-Joseph”, que permanece sendo a mais utilizada. Essa denominação se justifica pelo fato da Família Machado ter sido a primeira a ser descrita e da Família Joseph ser a maior e mais bem conhecida família com DMJ (MARTINS et al 2007, MARTINS et al, 2011).

Em 1993 estudos de ligação mapearam o gene da DMJ no braço longo do cromossomo 14 (TAKIYAMA et al, 1993). Em 1994, expansões CAG em um novo gene localizado no cromossomo 14q32.1 foram descritas como associadas à DMJ (KAWAGUCHI et al, 1994). No mesmo ano, a mesma região no cromossomo 14q24.3-q32.2 foi associado a famílias com SCA ainda sem diagnóstico molecular por um grupo de pesquisadores franceses, que acreditaram encontrar uma nova condição e a denominaram de SCA3 (STEVANIN et al, 1994-a). Nos meses seguintes os mesmos autores concluíram que as assim chamadas SCA3 e DMJ eram causadas por anormalidades no mesmo gene (STEVANIN et al, 1994-b), sendo finalmente aceitas como a mesma doença três anos depois (HABERHAUSEN et al, 1995). Atualmente ambas a denominações, SCA3 ou DMJ, são utilizadas e amplamente aceitas. Na presente revisão esta doença será referida como DMJ/SCA3.

Em relação ao histórico da mutação que causa a DMJ, estudos com haplótipos intragênicos (SNPs) mostram que a hipótese de uma origem portuguesa/açoriana (Ilha de Flores) proposta nas descrições iniciais da DMJ/SCA3 tem sido contestada por estudos multicontinentais recentes, que sugerem uma origem Asiática para a linhagem mais prevalente da doença (haplótipo ACA), permitindo datar a mutação original em mais de 7 mil anos (MARTINS et al 2007, MARTINS et al, 2012). Este mesmo haplótipo teria entrado no Brasil, França, norte dos Estados Unidos e Portugal.

### 2.2.3 Contexto Epidemiológico

A prevalência mínima da DMJ/SCA3 no RS é de 3:100.000 (PRESTES et al 2008), representando 78% das famílias do RS com SCAs (CASTILHOS et al, 2013). A maior prevalência mundial de DMJ/SCA3 relatada até hoje foi a detectada na Ilha de Flores, no arquipélago dos Açores, onde chega a atingir uma proporção de 1:140 indivíduos (BETTENCOURT et al, 2011). Números semelhantes parecem atingir o município de General Câmara, no Rio Grande do Sul, onde um levantamento identificou uma prevalência de 106:100.000 habitantes (CAMARGO, 2011). Esses dados podem ser explicados pela emigração de açorianos para o Sul do Brasil. Em 1751 chegou à ilha do Desterro (atual Florianópolis-SC) um grupo de açorianos e, destes, 60 casais foram enviados em 1752 para o Porto Dorneles – atual cidade de Porto Alegre. Provavelmente a partir deste período iniciou-se a história da Doença de Machado-Joseph no nosso Estado.

No entanto, esta prevalência de DMJ/SCA3 no RS parece estar ultrapassada. Recentemente uma pesquisa realizada com a coorte de famílias DMJ/SCA3 com registros clínicos e diagnósticos moleculares acompanhadas pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, estimou uma prevalência mínima de 6:100.000 (SOUZA et al submitted; Anexo E).

### 2.2.4 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas incluem: a ataxia cerebelar, que afeta a marcha, os movimentos apendiculares e oculares, a articulação da fala e a deglutição; uma síndrome piramidal, com hiperreflexia e espasticidade; uma oftalmoplegia externa progressiva; sinais extrapiramidais; alterações sensoriais devidas à neuropatia periférica; perda de peso e distúrbios do sono, entre outros (KIELING *et al*, 2007; KLOCKGETHER *et al.*, 1998). Dificuldade para urinar, fasciculações da face e da língua e problemas com o sistema nervoso autônomo também são relatados na literatura (NINDS, 2011). Envolvimento de órgãos fora do sistema nervoso central ou periférico é desconhecido; a exceção parece ser o emagrecimento progressivo dos afetados e que

não é explicado pela disfagia, apenas, e as alterações na via da insulina (SAUTE et al, 2011; SAUTE et al, 2012; RUSSO et al, 2015).

Em um estudo realizado por Kieling et al. (2007), a taxa de sobrevivência após o início dos sintomas, no estado do Rio Grande do Sul I, foi de 21 anos, em média. A sobrevivência média dos pacientes com DMJ/SCA3 é de 64 anos, significativamente menor do que os 78 anos de sobrevivência média dos seus parentes não afetados. Os pesquisadores também concluíram que a idade de início precoce e grandes expansões da sequência CAG são fatores preditores de redução da sobrevivência.

Na DMJ/SCA3 ocorre um fenômeno genético chamado “antecipação” o qual significa “o aparecimento progressivamente mais precoce e com intensidade aumentada de uma doença em gerações sucessivas”. Esse fenômeno tem sido observado em muitos pares de genitor/filho, por consequência os filhos acabam adoecendo oito a dez anos antes do que os seus pais (JARDIM *et al*, 2001; IUGHETTI *et al.*, 1998). O principal fator que explica a antecipação é a instabilidade do CAG expandida ao atravessar divisões celulares, em especial nas meiose paternas. Calcula-se que a variação média no número de CAG<sub>exp</sub> de uma geração para outra seja de + 0.84 repetições (MACIEL *et al.*, 1995). Antecipações graves dão origem a formas de início infantil e juvenil, nas quais os heterozigotos deixam de transmitir seu CAG<sub>exp</sub> por não deixarem descendência. Assim, a instabilidade do CAG<sub>exp</sub> seria uma característica que apresentaria uma tendência a reduzir, paulatinamente, a frequência de portadores da DMJ/SCA3 em uma dada população.

### 2.2.5 Aspectos moleculares e fisiopatologia

A sequência CAG nos alelos normais varia entre 12 e 40 repetições, enquanto a CAG<sub>exp</sub> varia entre 52 e mais de 90 repetições (PAULSON, 2007). Essa expansão acontece na matriz de leitura do gene *ATXN3* que codifica uma proteína chamada ataxina-3. O tamanho da CAG<sub>exp</sub> correlaciona-se diretamente com a gravidade dos sinais e sintomas, ou seja, quanto maior o número de repetições, mais graves são os mesmos, e inversamente com a idade de início, ou seja, quanto maior o número de repetições, mais cedo os sintomas se manifestam (MARUYAMA *et al.*, 1995).



A ataxina3 é um peptídeo que se localiza tanto no citoplasma como no núcleo de todas as células dos animais superiores. Sua principal função parece ser no controle de qualidade proteica celular e ocorre fora do núcleo, participando do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS). A *ATXN3* contém motivos de interação com a ubiquitina (UIMs) em sua estrutura (BURNETT & PITTMAN, 2003; COSTA & PAULSON, 2012), age como uma protease ubiquitina-específica (NICASTRO et al, 2005), está envolvida no reconhecimento de substratos proteolíticos pelo proteassoma (DOSS-PEPE et al, 2003), regula a formação de agressomas (BURNETT AND PITTMAN, 2005) e também, por via relacionada ao UPS, suprime a toxicidade induzida por PoliQ (WARRICK ET AL, 2005).

Um dos marcos patológicos na DMJ/SCA3 é a formação de neuroinclusões (NI) ou agregados intranucleares, em que um possível efeito tóxico direto tem sido intensamente debatido (COSTA & PAULSON, 2012). As poliglutaminopatias são causadas por proteínas com estrutura terciária anômala e com propensão à agregação (PAULSON, 1999). Essas proteínas misfolded, denominadas de ataxinas por estarem relacionadas às ataxias espinocerebelares, acumulam-se nas NIs junto com ubiquitinas e com chaperonas. Além de terem em comum uma poliQ, há também marcante sobreposição de sintomas entre essas afecções, com neurodegeneração predominante do cerebelo e de núcleos do tronco cerebral (PAULSON, 1999).

A composição das NI da DMJ/SCA3 inclui ubiquitina, atxn3, tratos de poliQ e vários fatores de transcrição (PAULSON, 1999). Além das NI, os neurônios afetados possuem grânulos citoplasmáticos imunomarcados com 1C2 (um anticorpo monoclonal contra PoliQ) que correspondem a um subgrupo de lisossomos, sugerindo que as vias de autofagocitose para a degradação proteica também têm relação com a *ATXN3* mutada (YAMADA, TSUJI & TAKAHASHI, 2002; YAMADA et al, 2008).

Como as NI não se correlacionam diretamente com a neurodegeneração elas têm sido consideradas atualmente como biomarcadores da falência celular no processo de limpeza da *ATXN3* mutada (COSTA & PAULSON, 2012).

### 2.2.6 Aspectos evolutivos – seleção natural e pleiotropismo antagonístico

A história dos haplótipos ancestrais de DMJ/SCA3 realizados por pesquisas até hoje, apontam poucas origens ancestrais (GASPAR et al., 2001; MARTINS et al, 2007). Segundos esses autores sua origem seria limitada a talvez cinco haplótipos ancestrais. O mais comum de todos, chamado haplótipo A-C-A, também denominado de Flores, é compartilhado por 70% ou mais da população mundial com DMJ/SCA3. Todas as famílias gaúchas, por exemplo, compartilham deste haplótipo (FURTADO, 2013). A última estimativa datou a idade deste haplótipo em mais de 7.000 anos. Somando-se o fato de que até hoje nenhum caso de mutação *de novo* foi detectado ao redor do mundo, ao fato de que 70% dos doentes com DMJ/SCA3 (os A-C-A) compartilham de um provável ancestral comum que viveu há mais de 7.000 anos, pode-se concluir que a instabilidade do CAGexp não foi suficiente para retirar esta mutação do pool genético da população e que forças divergentes, agindo em favor da manutenção de alelos expandidos no pool populacional devam ocorrer.

Duas evidências em favor de efeitos de seleção positiva relacionados à presença de uma CAGexp no gene *ATXN3* foram obtidas até o momento: a aparente maior fecundidade dos afetados pela DMJ/SCA3 do que a dos controles (PRESTES et al., 2007) e o aparente aumento da transmissão de alelos mutantes em relação aos alelos normais (TAKIYAMA 1997; JARDIM et al 2001), sugerindo que os gametas com a CAGexp tenham vantagens em relação aos gametas normais - embora este achado seja controverso para outros pesquisadores (GREWAL et al, 1999).

Estes potenciais efeitos favoráveis da CAGexp no *ATXN3* são contraditórios em relação aos que se produzem nos neurônios, na vida adulta (favoráveis para manter o gene na população e desfavoráveis por induzirem neurodegeneração nos indivíduos). Esse fenômeno é denominado de pleiotropismo antagonístico.

Evidências de pleiotropismo antagonístico relacionado a sequências CAG expandidas em genes específicos já foram levantadas para a Doença de Huntington (HD) e para a Ataxia Espinocerebelar tipo 1 (SCA1) (HARPER et al., 1996; FRONTALI et al., 1996), além da DMJ/SCA3.

Entre as patologias citadas acima, a doença de Huntington é a melhor estudada. A HD é uma doença autossômica dominante caracterizada por movimentos coreicos

involuntários progressivos, declínio cognitivo, distúrbios emocionais e psiquiátricos A HD é causada por expansão de repetições trinucleotídicas CAG no gene *HTT*. A idade média de início dos sintomas ocorre entre os 34 e os 45 anos, tal como a DMJ/SCA3, e os indivíduos acometidos têm uma sobrevida de 15 a 20 anos após o início dos sintomas (FRONTALI et al., 1996)

Apesar de seu efeito negativo ser tão impactante e grave, a CAGexp no gene *HTT* tem sido associada a pelo menos dois fenômenos positivos. Primeiro, Frontali e colaboradores (1996) demonstraram que portadores de HD com CAGexp na faixa das 47-54 repetições tiveram um número maior de filhos do que seus parentes não afetados, nas coortes estudadas (até os anos 1935-1950).

Em segundo lugar, como veremos ao longo desta revisão, existem evidências que apontam para um baixo risco de câncer nos portadores de HD.

### 2.3 Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Sua origem é considerada multifatorial, onde diversos fatores causais podem agir em conjunto ou em seqüência para iniciar ou promover a carcinogênese (INCA, 2012).

A incidência mundial de câncer cresceu 20% na última década. Estima-se que no ano de 2014 haverá 576 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo a região sul a segunda do país com a maior incidência de casos. O câncer de próstata para os homens e o câncer de mama para as mulheres apresentam as maiores incidências (INCA, 2013).

No Brasil o câncer representa a segunda causa de morte, conforme os dados do ministério da saúde. Ocorreram 1.819.291 mortes no país no período do ano de 2000 a 2011, com uma maior concentração de óbitos entre os indivíduos acima de 40 anos. No Rio Grande do Sul as taxas de mortalidade para os homens neste mesmo período foram de 155,63 óbitos por câncer para cada 100.000 homens e para mulheres, de 117,54 óbitos por câncer para cada 100.000 mulheres, números que colocam o RS como o Estado com as maiores taxas de mortalidade por câncer da União (DATASUS, 2012).

No entanto, a mortalidade fornece um quadro incompleto da carga de uma doença. Um importante estudo sobre a carga de doença no Brasil, que utilizou estatísticas de saúde de 1998 e empregou *disability adjusted life years* (DALYs- anos de vida perdidos ajustados por incapacidade), mostrou que as doenças crônicas foram responsáveis por 66% de DALYs (SCHMIDT *et al.*, 2011); doenças infecciosas, maternas e perinatais foram responsáveis por 24 % e causas externas, por 10%. O câncer (parte das doenças crônicas) foi responsável por cerca de 6% (valor absoluto) de DALY no Brasil neste período. (SCHRAMM *et al.*, 2004).

O estudo sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis realizado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) teve como objetivo conhecer o número de pessoas expostas aos principais fatores de risco para as doenças que mais matam no Brasil: câncer, doenças cardiovasculares e acidentes de trânsito, entre outras. Diversos inquéritos sobre hábitos relacionados à alimentação, atividade física entre outros, foram aplicados em 23.457 indivíduos residentes em 10.172 domicílios das capitais brasileiras de ambos os sexos com idade acima de 15 anos. Destaca-se que a capital gaúcha teve o maior número de fumantes, independente do sexo dos indivíduos, e também apresentou uma alta taxa no quesito do consumo de risco de álcool (INQUÉRITO DOMICILIAR, 2002).

Essa elevada taxa de comportamentos que influenciam no aparecimento de neoplasias específicas, como no caso do uso de tabaco e o desenvolvimento do câncer de pulmão, pode ser uma das principais explicações para a elevada taxa de mortalidade relacionada ao câncer no RS. Contudo, fatores genéticos também são relevantes no processo de carcinogênese, com estimativas de que 5% a 10% dos diversos tipos de câncer estejam associados a síndromes hereditárias de predisposição ao câncer. (INCA, 2012).

A carcinogênese resulta de múltiplas etapas e pode envolver vários genes por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos. Os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (DANTAS *et al.*, 2009). Muitos desses genes já foram descobertos, identificados e relacionados a certos tipos de câncer. O papel das expansões de sequência CAG entre os potenciais fatores genéticos modificadores do câncer será revisto a seguir.

## 2.4 O câncer nas Poliglutaminopatias

Um risco reduzido para câncer poderia ser um dos efeitos pleiotrópicos das expansões CAG associadas a doenças neurodegenerativas. Se real, esse risco reduzido poderia ser um dos fatores que explicariam a manutenção da frequência dessas condições na população. A redução da incidência de câncer também já foi relatada em outras doenças neurodegenerativas associadas ao acúmulo de proteínas anormais, como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Uma meta-análise de 29 estudos sobre a doença de Parkinson descreveu tal associação (BAJAJ et al.,2010). Achados semelhantes também foram citados na doença de Alzheimer (DA) sugerindo a possibilidade de que o câncer e a neurodegeneração estejam em pólos opostos de uma via biológica comum, possivelmente relacionada ao ciclo celular (SHI HB et al,2012)

Em outro estudo de base populacional espanhol com total de 5.278 idosos, acompanhados em média de 12,5 anos, 1.976 (47,1%) morreram durante o período da pesquisa e destes 277 tinham o provável diagnóstico de DA, e seus certificados de óbito foram analisados. A frequência de câncer foi menor entre DA (5,8%) e outras demências,(6,3%) e nos pacientes sem nenhuma demência diagnosticada (26,5%) (ROMERO JP, et al,2014).

SORENSEN et al. (1999) constataram que há uma baixa incidência de câncer nos indivíduos com HD. Os autores compararam a incidência de câncer entre 694 pacientes com HD (ou 11.190 pessoas-ano de follow-up) e 695 parentes em risco de mesma idade (ou 11.121 pessoas-ano). Entre os HD, 55 cânceres foram observados, enquanto entre seus controles 161 cânceres foram detectados.

A hipótese que os autores levantaram foi a de que huntingtina com a poliQ expandida teria um efeito pró-apoptótico. Assim como ocorre com a *ataxina 3* (poliglutamina da DMJ/SCA3), a proteína huntingtina mutada tem um ganho de função levando à perda neuronal, principalmente no núcleo caudado. Há evidências de que essa perda se dá através de um aumento da apoptose. Entre as inúmeras pesquisas conduzidas sobre a fisiopatologia da HD, é relevante mencionar brevemente aqui algumas sugestões de que a huntingtina possa participar de vias de morte celular. Por exemplo, a huntingtina é suscetível à clivagem por *apoptina 8*, uma enzima responsável

pela apoptose em células de mamíferos; e há evidências em favor da associação da huntingtina, com a proteína p53, proteína supressora de câncer por induzir apoptose (KERR et al., 2002; FENG et al., 2006).

JIANGUANG e colaboradores (2012) analisaram 1.510 pacientes com doença de Huntington (HD), 471 com Atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA) e 3.425 com ataxia hereditária (HA), todos identificados ao longo de um período de 50 anos na Suécia. A incidência observada/esperada nesse intervalo gerou uma “razão de incidências padronizadas” (ou standardised incidence ratios, SIR). Se a incidência observada fosse semelhante à esperada à SIR seria igual ou semelhante à 1. O câncer foi diagnosticado em 91 (6,0%) pacientes com HD, em 34 (7,2%) pacientes com atrofia muscular espinhal e bulbar, e em 421 (12,3%) pacientes com HA. As incidências observadas apontaram para riscos significativamente reduzidos em todas as doenças por poliQs (HD: 0,47, IC 95%: 0,38–0,58; SBMA: 0,65, IC 95%: 0,45–0,91; e HA: 0,77, IC 95%: 0,70–0,85).

Em outro grande estudo envolvendo duas bases de dados hospitalares da Inglaterra [LHES, com dados de 1999-2010 (população: 52 milhões); e ORLS, com dados de 1963-1998 (cobertura muito menor do que LHES)] a relação entre o desenvolvimento de câncer com as doenças por poliQs também foi avaliada (Turner et al., 2013). Na base de dados LHES, 4865 indivíduos com HD, 599 com SBMA e 9084 com HA foram avaliados para o risco relativo em relação à coorte de referência de desenvolver câncer. Os resultados do estudo confirmaram uma reduzida incidência de câncer nos indivíduos com HD (RR 0.71; IC 95%: 0,61-0,83), porém não houve alteração do risco para SBMA e foi relatado inclusive um pequeno aumento do risco de desenvolver câncer para pacientes com HA (RR 1.2; IC 95%: 1,10-1,30).

Cabe ressaltar que ambos os estudos: sueco e inglês utilizaram bases de dados retrospectivas e que o diagnóstico molecular e número de repetições CAG nos alelos expandidos não estavam disponíveis para nenhum dos diagnósticos. Para a HD, os dados podem ser considerados mais confiáveis uma vez que há código específico para esta afecção na Classificação Internacional das Doenças (CID, nas revisões 8, 9 e 10) e o diagnóstico clínico tem alta acurácia. Já a classificação utilizada para a SBMA, além de mais recente (CID-9 e 10), não é específica – G12.1 e a utilizada para HA foi muito

heterogênea. Ambas as categorias incluíram outras condições além das devidas a poliglutaminas.

### 3. JUSTIFICATIVA

Na literatura atual não há estudos sobre a potencial associação entre DMJ/SCA3 e risco de câncer. Pesquisadores portugueses realizaram um levantamento na ilha dos Açores sobre as causas de morte da DMJ/SCA3; no entanto, não valorizaram as aparentes diferenças de frequência do câncer como causa de morte entre casos DMJ com diagnóstico molecular (3,6% de 31 casos estudados) e seus controles (8,5% de 31 controles estudados) (LIMA et al., 1998).

Diferentemente dos pesquisadores escandinavos e britânicos (SORENSEN et al. 1992; 1999; JI et al. 2012; TURNER et al. 2013), não existe uma base de dados epidemiológicos no Brasil que associe o diagnóstico do câncer em geral com o diagnóstico de uma poliQ. Estudos que estimem a incidência cumulativa de câncer (ICC) em um grupo e a comparem com a população geral – ou com uma amostra representativa da mesma – dependem exclusivamente de um levantamento feito contemporaneamente e a partir de entrevistas ou de buscas ativas de prontuários. Por isso, optamos por enfrentar a questão através de um estudo transversal. Um grupo de sujeitos portadores de DMJ/SCA3 seria estudado e comparado com um grupo controle não relacionado, através de um questionário estruturado que buscasse a CIC nos últimos 15 anos nesses dois grupos – o assim chamado “survey”. O protocolo do mesmo encontra-se no Anexo A.

Por conta disso, toda a coorte de casos DMJ/SCA3 do Rio Grande do Sul – um registro de casos diagnosticados nos laboratórios de Identificação Genética do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) e do Serviço de Genética Médica do HCPA – foi a base de dados para a busca de participantes do survey: 178 famílias com 4837 indivíduos informados. Como todas essas famílias foram buscadas para a realização do presente projeto, a atualização geral do número de indivíduos vivos sintomáticos e em risco, e do padrão de transmissões CAG dentro das famílias foi possível. Esse levantamento prévio não somente permitiu o atual estudo, como gerou um artigo adicional que está

submetido nesse momento na revista *Clinical Genetics* (ANEXO E). Esse artigo está apresentado nos Anexos por duas razões. Primeiro, ainda não está publicado, enquanto o seu conteúdo dá subsídios para a atual dissertação. E segundo, porque a autora executora principal foi a candidata da presente dissertação, que coordenou a maior parte das entrevistas durante o seu Mestrado.

Finalmente, a presente investigação se justifica por abordar duas condições bastante graves no seu impacto à saúde das pessoas: a doença neurodegenerativa e o câncer. Nossa hipótese é a de que a CAGexp no gene *ATXN3* conferiria proteção contra o câncer. Se estivermos corretos, nossos dados trarão mais subsídios à investigação e poderão inspirar abordagens terapêuticas novas e que talvez acrescentem eficácia ao cuidado de ambos os grandes grupos de condições.

## **4. OBJETIVOS**

### 4.1 Objetivo geral

Estimar se frequência do câncer em geral entre portadores da DMJ/SCA3 é diferente da encontrada entre controles não relacionados e entre a população geral.

### 4.2 Objetivos específicos

- Comparar a incidência acumulada de câncer entre os afetados pela DMJ/SCA3 vivos, com mais de 18 anos, com a incidência em um grupo controle não relacionado, nos últimos 15 anos.
- Comparar a taxa de mortalidade relacionada ao câncer nos afetados por DMJ/SCA3 entre os anos 2000 e 2015, com os dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) sobre o estado do Rio Grande do Sul.



## REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- BAJAJ A, Driver JA, Schernhammer ES. Parkinson's disease and câncer risk: a systematic review and meta-analysis. *Câncer Causes Control*. May; 21(5):697-707, 2010.
- BETTENCOURT C, Lima M. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis.*;6:35. 2011
- CAMARGO, G. Mutação do gene *ATNX3* da Doença de Machado-Joseph no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos e de comportamento meiótico. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS. Março 2011.
- CASTILHOS et al. Spinocerebellar ataxias in Brazil-frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum*. Feb;13(1):17-28, 2013.
- COSTA M DO C, PAULSON HL. Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*;97:239–257.2012
- DANTAS, ELR, et al, Genética do C ncer Heredit rio, *Revista Brasileira de C ncerologia*,. V55, p-263-269, 2009.
- DOSS-PEPE EW, STENROOS ES, JOHNSON WG, MADURA K. 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*. Sep;23(18):6469–83. 2003
- FENG et al. p53 tumor suppressor protein regulates the levels of huntingtin gene expression. *Oncogene*. Numeber: 25, Page: 1–7.2008
- FURTADO, V. G, Origem Ancestral da Doença de Machado Joseph: Abordagem Molecular. Dissertação de mestrado da UFRGS, 2013
- GASPAR PA, KVITKO K, PAPADOPOLIS LG, HUTZ MH AND WEIMER TA High frequency of CYP1A12C allele in Brazilian populations. *Hum Biol* 74:235-242, 2001.
- GREWAL, D., MONROE, K. B., & KRISHNAN, R. The effects of price-comparison advertising on buyers' perceptions of acquisition value, transaction value, and behavioral intentions. *The Journal of Marketing*, 62(2), 46-59. 1998
- HABERHAUSEN G, DAMIAN MS, LEWEKE F, MÜLLER U. Spinocerebellar ataxia, type 3 (SCA3) is genetically identical to Machado-Joseph disease (MJD). *J. Neurol. Sci*. Sep;132(1):71–5, 1995.

IUGHETTI P, OTTO P, ZATZ M, BUENO MRP AND MARIE SK .Different behavior in the paternally vs.maternaly inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. Am J Med Genet 77:246-248. 1998

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Câncer no Brasil, 2013. Disponível em <http://www.inca.gov.br/câncernobrasil/2015/>

INCA, Instituto Nacional do Câncer, inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis,2002. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/inquerito\\_online/apresentacao.asp](http://www.inca.gov.br/inquerito_online/apresentacao.asp)

JARDIM & SAUTE. Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current Treatment. Expert Opinion on Orphan Drugs, 2015.

JARDIM, L.B. et al. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil – 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease–causing mutations. Journal of Neurology, Berlin /Heidelberg, v. 248, n.10, p. 870–876, 2001

JIANGUANG JI, KRISTINA SUNDQUIST, JAN SUNDQUIST. Câncer incidence in patients with polyglutamine diseases:a population-based study in Sweden..The lancet.Oncology Vol 13 June 2012.

KAWAGUCHI Y, OKAMOTO T, TANIWAKI M, et al. CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nature Genet:8:221-8, 1994.

KERR, C. Huntington’s disease provides câncer clues. THE LANCET Oncology. Vol 3, September, 2002.

KIELING, C. et al. Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). Clinical Genetics, United States of America v. 72, n.6, p. 543–5, 2007.

KLOCKGETHER T, Lüdtke R, Kramer B, Abele M, Bürk K, Schöls L, et al. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. Brain. Apr;121 (Pt 4):589-600, 1998.

LIMA et. al Causes of death in Machado-Joseph disease: A case-control study in the Azores (Portugal).Arch. Neurol. Vol. 55, Oct,1998.

MARTINS et al. Asian Origin for the Worldwide-Spread Mutational, Arch Neurol. 2007; Vol. 64(10); p-1502-8.Oct 2007.

MARTINS S, SOONG B-W, WONG VCN,et al. Mutational origin of Machado-Joseph disease in the Australian Aboriginal communities of Groote Eylandt and Yirrkala. Arch Neurol;69:746-51, 2012.

MARUYAMA H, NAKAMURA S, MATSUYAMA Z et al. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*: 4 (5): 807–812. 1995.

NAKANO KK, DAWSON DM, SPENCE A. Machado disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*. 22(1):49-55, 1972.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE (NINDS).new clinical scale. Machado- Joseph Disease. United of America. Disponível em: <[http://www.ninds.nih.gov/disorders/machado\\_joseph/machado\\_joseph.html](http://www.ninds.nih.gov/disorders/machado_joseph/machado_joseph.html)>

NICASTRO G, MENON RP, MASINO L, KNOWLES PP, MCDONALD NQ, PASTORE A. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Jul 26;102(30):10493–8. 2005

PAULSON H. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am. J. Hum. Genet.* Feb;64(2):339–45. 1999

PAULSON H. Polyglutamine neurodegeneration: minding your Ps and Qs. *Nat. Med.* Jul;9(7):825–6. 2003

PAULSON H. Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handb Clin Neurol*.103:437–49. 2012

PAULSON H. Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol.* Apr;27(2):133–42. 2007

PRESTES et al, Machado-Joseph Disease Enhances Genetic Fitness: A Comparison Between Affected and Unaffected Women and Between MJD and the General Population. *Annals of Human Genetics*, number: 72, Page:57–64,2008.

PRESTES, et al.,Asian Origin for the Worldwide-Spread Mutational Event in Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol.* Number :64, Page:1502-1508, 2008.

ROMANUL F, FOWLER H, RADVANY J, FELDMAN R, FEINGOLD M. Azorean disease of the nervous system. *N Engl J Med*; 296: 1505-1508. 1997

ROMERO JP, BENITO-LEÓN J, LOUIS ED, BERMEJO-PAREJA F. Alzheimer's disease is associated with decreased risk of câncer-specific mortality: a prospective study (NEDICES).*J Alzheimers Dis.* 2014.

ROTH et al. Consistency of self-reported first-degree family history of câncer in a population-based study. *Familial Câncer.* Number , p:195–202. 2009.

ROE CM et al. Câncer linked to Alzheimer disease but not vascular dementia. *Neurology.* Jan 12;74(2):106-12, 2010.

ROSENBERG RN, NYHAN WL, BAY C, SHORE P. Autosomal dominant striatonigral degeneration: a clinical, pathologic and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*.; 26(8):703-714. 1976

RUSSO AD et al. Clinical Scales Predict Significant Videofluoroscopic Dysphagia in Machado Joseph Disease Patients. *Movement Disorders - Clinical Practice* Vol. 2,2015.

SAUTE JAM et al. Body mass index is inversely correlated with the expanded CAG repeat length in SCA3/MJD patients. *Cerebellum*. Sep;11(3):771-4, 2012.

SAUTE JAM et al. Serum insulin-like system alterations in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord*. Mar;26(4):731-5. 2011

SEQUEIROS J, MARTINS S, SILVEIRA I, Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias. *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 103, p 228-255,2012.

SILVA, R. C.R, et al. Occupational therapy in spinocerebellar ataxia type 3: an open-label trial. *Braz J Med Biol Res*. Brazil, vol.43, n 6, p.537-542,2010.

SOUZA et al. Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph: segregation patterns and epidemiological factors influencing CAG instability. To submitted *Clinical Genetics*.

SØRENSEN S. et al. Significantly Lower Incidence of Câncer among Patients with Huntington Disease An Apoptotic Effect of an Expanded Polyglutamine Tract? *CÂNCER*. October 1, Volume 86, Number 7, 1999.

SORENSEN S, FENGER K. Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. *J Med Genet*; 29: 91 1-914, 1992.

SCHMIDT, MI et al., Doenças Crônicas não Transmissíveis no Brasil; carga e desafios atuais. *The Lancet, Série 6 Saúde do Brasil*, 2011.

SCHRAMM, JM, OLIVEIRA, AF, LEITE, IC. Transição epidemiológica e o estudo de carga ou doenças no Brasil. *Cien Saúde Coletiva*, V.9, p-897-908, 2004.

SCHÖLS L, BAUER P, SCHMIDT T, SCHULTE T, RIESS O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics and pathogenesis. *The Lancet Neurology*. Vol 3 May, 2004.

SHI HB, TANG B, LIU YW, WANG XF, CHEN GJ. Alzheimer disease and cancer risk: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. Mar;141(3):485-94. 2015

STEVANIN G, LE GUERN E, RAVISÉ N, CHNEIWEISS H, DÜRR A, CANCEL G, et al. A third locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type I maps to chromosome 14q24.3-qter: evidence for the existence of a fourth locus. *Am. J. Hum. Genet*. Jan;54(1):11–20, 1994a.

STEVANIN G, SOUSA PS, CANCEL G, DÜRR A, DUBOURG O, NICHOLSON GA, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to the same 3-cM interval as the spinal cerebellar ataxia 3 gene on chromosome 14q. *Neurobiol. Dis.* Nov;1(1-2):79–82, 1994b.

TAKIYAMA Y, Nishizawa M, Tanaka H, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet.*4:300-3, 1993.

TURNER MR, GOLDACRE R, GOLDACRE MJ. Reduced cancer incidence in Huntington's disease: record linkage study clue to an evolutionary trade-off? *Clin Genet.* Volume 83. p 588-590, 2013.

WARRICK JM, MORABITO LM, BILEN J, GORDESKY-GOLD B, FAUST LZ, et al. Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol. Cell.* Apr 1;18(1):37–48. 2005

WOODS BT, SCHAUMBURG HH. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci.*; 17(2):149-166. 1972

## 5 ARTIGO CIENTIFICO EM INGLÊS

### To be submitted to the Clinical Genetics

#### **Cancer in Machado Joseph disease patients – low frequency as a cause of death**

Gabriele Nunes Souza<sup>1</sup>, Nathália Kersting dos Santos<sup>1</sup>, Thomaz Abramsson Gonçalves<sup>2</sup>, Daphne Louise Oliveira Pacheco<sup>3</sup>, Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>4,6,7</sup>, Jonas Alex Morales Saute<sup>1,6</sup>, Laura Bannach Jardim<sup>1,5,6,7</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>2</sup> Escola de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>3</sup> Serviço Social, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>5</sup> Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>6</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

<sup>7</sup>Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP).

Corresponding author

Prof. Laura Bannach Jardim

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Rua Ramiro Barcelos 2350,

Zip Code 90.035-903, Porto Alegre, Brazil

Phone 5551 33598011

Fax 5551 3359 8010

Email: ljardim@hcpa.edu.br

#### **Conflict of interest statement**

Gabriele N. Souza, Nathalia Kersting, Thomaz A. Gonçalves, Daphne Pacheco, Maria L. Saraiva-Pereira, Jonas A.M. Saute and Laura B. Jardim have no conflicts of interest.

#### **Acknowledgements**

The author would like to thank all families and subjects who participated in this survey. We are grateful to Raphael Castilhos for his help with Progeny training. This study was supported by FAPERGS (1209-2551/13-4), CNPq (478057/2012-1), and FIPE-HCPA (14-0204). GNS, NK, DP, TAG, MLSP and LBJ were supported by CNPq.

**Word count:** Abstract 1: 250 and Abstract 2: 200

Total article (abstract 1, manuscript, figures, tables and references):11430 Words.

Tables: 1,2,3. References 22

## **Abstract 1**

**Background:** polyglutamine diseases have been related to a reduced risk for cancer. This association was not studied in Spinocerebellar ataxia type 3 /Machado Joseph disease (SCA3/MJD) yet. **Aims:** to compare the 15 years cumulative incidence of cancer (CIC) and the proportion of cancer as a cause of death in symptomatic SCA3/MJD carriers with those observed in controls. **Methods:** SCA3/MJD individuals belonging to the Rio Grande do Sul cohort from 2000 to 2015 were identified. A structured interview was done with affected individuals and with unrelated controls. CIC as published by the National Institute of Cancer (INCA), Brazil, was used as a population control. Causes of death among SCA3/MJD families and paired unrelated controls were also obtained from the Public Information System on Mortality. **Results:** 154 SCA3/MJD patients and 80 unrelated controls were interviewed. CIC were 7/154 (4.5%) and 5/80 (6.3%) among SCA3/MJD and unrelated control individuals, respectively. For an absolute risk reduction of 1.8 between cases and controls, 1,938 individuals per group would be needed to detect a significant difference between groups. Since the total symptomatic SCA3/MJD population equaled 625 individuals in 2015, this study was interrupted. Cancer was a cause of death in 9/101 (8.9%) SCA3/MJD and in 52/202 (26.2%) controls, with an absolute reduction risk of 17.3% in the SCA3/MJD group ( $\chi^2=12.421$ ;  $p=0.001$ ; OR 0.27, 95%CI 0.13 to 0.58). **Discussion:** Due to the rarity of SCA3/MJD, CIC studies with statistical power are unfeasible. However, we detected a significant reduction of cancer as a cause of death in SCA3/MJD.

## Abstract 2

Since polyglutamine diseases have been related to a reduced risk for cancer, we aimed to compare the 15 years cumulative incidence of cancer (CIC) and the proportion of cancer as a cause of death in symptomatic carriers of spinocerebellar ataxia type 3 /Machado Joseph disease (SCA3/MJD) with those observed in controls. SCA3/MJD individuals from the Rio Grande do Sul cohort were identified. A structured interview was done with patients and unrelated controls. CIC as published by the National Institute of Cancer, Brazil, was used as a population control. Causes of death were obtained from the Public Information System on Mortality. We interviewed 154 SCA3/MJD patients and 80 unrelated controls: CIC were 7/154 (4.5%) and 5/80 (6.3%), respectively. For an absolute risk reduction of 1.8, 1,938 individuals per group would be needed to detect a significant difference between groups. Since local symptomatic SCA3/MJD population equaled 625 individuals in 2015, this study was interrupted. Cancer was a cause of death in 9/101 (8.9%) SCA3/MJD and in 52/202 (26.2%) controls, with an absolute reduction risk of 17.3% in the SCA3/MJD group ( $\chi^2=12.421$ ;  $p=0.001$ ; OR 0.27, 95%CI 0.13 to 0.58). Therefore, we detected a significant reduction of cancer as cause of death in SCA3/MJD.

## Key words

Cancer; Causes of Death; Machado-Joseph disease; MJD; polyglutamine diseases; spinocerebellar ataxia type 3; SCA3

## 1. Background

Machado Joseph disease, also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3/MJD), is an autosomal dominant polyglutamine (polyQ) disorder caused by a CAG repeat expansion (CAGexp) at *ATXN3* gene [1,2]. SCA3/MJD starts around 32-40 years and presents a relentless and disabling clinical course. Ataxia is usually the first and main neurological deficit, affecting gait, speech, swallowing, and limbs coordination. Pyramidal, extrapyramidal and peripheral nerve findings also occur during disease course



[3]. Survival is reduced and the median survival time after onset is 21 years [4]. Expansion of the polyQ tract in *ATXN3* is thought to promote an altered conformation in the protein ataxin-3, leading to changes in interactions with native partners and to the formation of insoluble aggregates [5]. Other polyQ diseases associated with neurodegenerative syndromes might share some common cellular pathways, such as Huntington's disease (HD), X-linked spinobulbar muscular atrophy (SBMA, Kennedy's disease), dentato-rubropallido-luysian atrophy (DRPLA) and spinocerebellar ataxias type 1, 2, 6, 7 and 17 (SCA1,2,6,7,17) [5,6].

Neurodegenerative disorders such as SCA3/MJD have been a puzzle for evolutionists [7]. The emergence of such conditions mostly in post-reproductive life seems to put them away from negative selection; in this perspective, neurodegeneration would represent an unexpected consequence of increased life expectancy. In contrast, it seems that individuals and lineages carrying neurodegenerative disorders could have been favored by some advantages such as a reduced risk for cancer. Reduced risks of cancer have been reported for patients with Alzheimer's and Parkinson's disease [8,9]. This might be also the case of polyQ diseases. Lower-than-expected incidences of cancer mostly among HD patients but also among SBMA and ataxic individuals have been reported in Danish, Swedish and British populations [10,11,12]. Independently from the cellular pathways involved the association between polyQ diseases and protection against cancer would be a very nice example of antagonistic pleiotropism [13].

In this study we analysed data from the SCA3/MJD cohort of Rio Grande do Sul, Brazil [14]. Our aim was to estimate the frequency of cancer in general in the living population, as well as the frequency of cancer among causes of death among SCA3/MJD, in our region.

## **2. Methods**

A cross-sectional study was performed on SCA3/MJD individuals and families belonging to the Rio Grande do Sul cohort, a registry of all individuals and families molecularly diagnosed and followed in the Neurogenetics Clinics at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) from 2001 to 2015. One hundred and seventy eight SCA3/MJD families were registered during this period (Souza et al, submitted). This registry includes family history, clinical and molecular data of all symptomatic individuals with molecular diagnosis; data were kept under protected files in our institution, and included information on pedigree relationships, gender, phenotype status,

date of birth, age at death, age of onset of first symptom (AO) and CAG repeats length.

The present study was done from June 2014 to September 2015, when personal interviews and telephone calls were done. After consent, a structured interview was performed asking for updating information on family history, occurrence of cancer in the family, changes in phenotypic status and deaths in the family during the last 15 years.

Data about cancer on the living people with SCA3/MJD, in the last 15 years, was compared to those obtained in two different control groups. The first was a group of paired, unrelated individuals – caregivers and friends, and voluntary blood donors. Data about the cumulative incidence of cancer in the last 15 years, published by the National Institute of Cancer (INCA), Brazil, was used as a the second, populational control. The cumulative incidences of cancer (CIC) in this time period were obtained and compared between groups.

Causes of death in patients with MJD, in the last 15 years, were obtained from the structured interviews with their relatives and from the Public Information System on Mortality (SIM) of Rio Grande do Sul state, Brazil. They were compared to those obtained from paired, unrelated, deceased controls. Two controls per deceased MJD case (2:1 ratio) were identified from SIM, according to the following criteria: same gender and age of the MJD deceased case;

### **Statistical Analysis**

Normal distribution of variable was assessed with the one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Baseline comparisons between cases and controls for continuous variables were performed with two-tailed unpaired Student's t test or Mann Whitney U test and for categorical variables with Chi-square test. Chi-square test was also used to compare the CIC and the causes of death between MJD individuals and controls and the Odds Ratio (OR) of differences with 95% confidence intervals (CI) were informed. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . Sample size calculations were performed with WinPepi and other comparison with SPSS 20.0.

This study was registered as CAAE 27798214.0.0000.5327, and was approved by the Ethics Committee (EC) from the Institution at which the work was performed – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – which follows the Code of ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and the standards established by the author's

Institutional Review Board and funding agency. We have obtained written informed consent from all participants.

### 3. Results

#### 3.1 Data about cancer on the living people with SCA3/MJD

One hundred and fifty four symptomatic individuals with SCA3/MJD and 80 unrelated controls were interviewed by the time of our first interim analysis, in March 2015. **Table 1** shows demographic characteristics of groups. Lower mean body mass index ( $p=0.002$ ) and fewer individuals reporting alcohol consumption ( $\chi^2=7.429$ ;  $p=0.006$ ) were seen in cases, whereas cases reported a non-significant higher incidence of tobacco usage ( $\chi^2=3.725$ ;  $p=0.054$ ) and smoking history pack-years ( $p=0.217$ ) than controls.

There were 7/154 (4.5%) cases of cancer among SCA3/MJD symptomatic individuals versus 5/80 (6.25%) among controls ( $\chi^2=0.314$ ;  $p=0.575$ ; OR 0.71, IC 95% 0.22 to 2.32). For an absolute risk reduction (ARR) – ie, [6.25% - 4.5%] - of 1.8 between cases and controls, 1,938 individuals per group would be needed to achieve a 80% power to detect a significant difference between groups, in a monocausal comparison,  $p<0.05$ ).

According to INCA, in the general population of our region CIC equals 6% in the last 15 years. For an ARR of 1.5 between SCA3/MJD symptomatic cases and population, 1,886 SCA3/MJD individuals would be needed to achieve the same conditions mentioned above.

In parallel with this cross-sectional study, an update of the overall SCA3/MJD Rio Grande do Sul cohort was done. The total number of symptomatic individuals living in this state equaled 625, in 2015 (Souza et al submitted). Since the total population is smaller than the estimated number of individuals needed to detect a significant difference of CICs between groups, this cross-sectional arm about cancer on the living people with SCA3/MJD was interrupted.

#### 3.2 Data about cancer as a cause of death in SCA3/MJD

One hundred and fifty nine families were retrieved, comprising 94% of the overall data set (Souza et al, submitted).

Between 2000 and 2015, 101 deaths were identified among SCA3/MJD symptomatic individuals belonging to 72/159 SCA3/MJD families; no deaths were identified among the other 87 families in this time period.

Mean age at death was  $54 \pm 15$  years of age, after a mean disease duration of 17.6 years. Two hundred and two control deaths were identified. Cancer was the cause of death in 9/101 (8.9%) SCA3/MJD and in 52/202 (26.2%) controls, with an ARR of 17.3% in the MJD group ( $\chi^2=12.421$ ;  $p<0.001$ ; OR 0.27, IC 95% 0.13 to 0.58). The characteristics of both groups are depicted in **Table 2**.

When SCA3/MJD death cases were stratified into early ( $\leq$  mean DD after onset, 17 years ) and late death, the obtained rates of cancer as a cause of death of these subgroups were similar (data not shown). SCA3/MJD individuals who died from cancer were older and carried shorter CAGexp than those SCA3/MJD cases who died from other causes **Table 2**.

Among all individuals who died from cancer, SCA3/MJD individuals were older than controls (**Table 3**). Females were more common among controls than among SCA3/MJD deaths. Several types of cancer were detected. The most common included breast and uterine cancer, and all were particularly rare - or even absent - among SCA3/MJD deaths.

#### 4. Discussion

Cancer as a cause of death was less frequent in SCA3/MJD than in unrelated controls. A trend for a reduced CIC was observed among living, symptomatic SCA3/MJD patients. Among SCA3/MJD individuals deceased, those who died from cancer had shorter CAGexp than those who died from other causes. This survey together with former populational studies raised consistent evidence of a decreased incidence of cancer in patients with polyQ diseases, in general.

We examined causes of death from death certificates for 103 SCA3/MJD subjects and 206 unrelated controls. The rate of cancer was low for SCA3/MJD, being 8.9% versus 26.2% in controls. Moreover, among all deaths related to cancer, SCA3/MJD subjects died at a later age than controls. Causes of death in a small sample of SCA3/MJD subjects have been reported once before us: an apparently reduced number of deaths due to cancer was not valued by the authors [15]. Low proportion of deaths from cancer in HD subjects was noted before, in pre-molecular era [16,17,18]. Rates very similar

to ours were found by a Danish study that reported causes of death for 395 HD subjects and 282 unaffected sibs: the rate of cancer was 5.3% in HD and 31.2% for the sibs [19]. The lower frequency was not the result of the shorter life span of those HD subjects or of the present SCA3/MJD individuals, since in both studies this was corrected.

A low overall incidence of cancer among HD individuals in Denmark was reported by Sorensen et al (1999)[ 10]. The standardized incidence ratio for the HD patients was 0.6 (95% CI of 0.5– 0.8). Ji et al used the Swedish Registries to identify virtually all individuals with cancer and with HD, SBMA, and hereditary ataxias (HA) (a proxy for SCAs 1, 2, 3, 6, 7, and 17 due to the lack of specific diagnostic codes for these diseases) for a 40 years period, in that country [12]. The overall standardised incidence ratios showed significantly reduced risks of cancer in all polyQ disease groups (HD, 0.47, 95% CI 0.38–0.58; SBMA, 0.65, 0.45–0.91; and HA, 0.77, 0.70–0.85) (Ji et al 2012). Turner et al (2013) [12] used two large hospital record databases from England to search HD, SBMA, and HA individuals, and found a significantly reduced incidence of cancer in HD (0.71, 95% CI 0.61–0.83), but not for SBMA or HA.

In contrast to the former populational studies, we did not achieve significance in our survey of cancer among living individuals with SCA3/MJD. Among 154 symptomatic individuals interviewed (with higher smokers and smoking history rates than controls), 7 cancers were observed in a 15 years-period (9.6 were expected based on our population risk). Circa 1,900 individuals would be needed to detect this ARR, a much higher number than the 625 living patients in our state.

The SCA/MJD population of our state is similar in number to the HD population studied by Sorensen et al (1999), of 694 patients where the CIC in 16 years was significantly lower than expected. While the ARR for cancer was 4.76 among Danish HD, it would be 1.5 among Brazilian MJD individuals. If the protective effect observed in our SCA3/MJD living patients is real, it seems to be smaller than the effect observed in European HD populations [10,11,12]. Due to the absence of specific codes for SCAs, they have only been indirectly studied before us, by approaching all the subjects with HA [11, 12]. A reduced risk of cancer among HA was found in one [11] but not in other study [12]; when significant, the risk for cancer was higher for HA than for HD patients [12]. These results might suggest that the polyQ protective effect against cancer would not be so strong for SCAs as for HD. Alternatively, pooling SCAs with other ataxic conditions (like ataxia

teleangiectasia, a well-known cancer-related condition) would hamper the detection of the real effect size. At this moment we cannot discard none of these hypotheses.

All these data suggest that a common mechanism of polyQ diseases protects against the development of cancer. Mechanisms of action might be raised by some exploratory hypotheses such as differential effects related to different forms of cancer, or to differences in the severity degree of the mutation - the CAG expanded length.

Although the numbers for individual cancers in our sample were small and prevented further stratification, the relatively low proportion of females among SCA3/MJD deaths related to cancer draws attention (Table 3). Curiously, we did not find any analysis on gender effects in former studies (Sorensen et al 1992-9; Ji et al 2012; Turner et al 2013) [11, 12, 13]. We speculate if breast and female genital organs would be more sensitive towards a polyQ protection, at least in SCA3/MJD.

SCA3/MJD individuals who died from cancer were older and carried shorter CAG<sub>exp</sub> than those SCA3/MJD cases who died from other causes (**Table 2**). Therefore, the modifying role for the CAG repeat length itself also warrants further investigation.

PolyQ-containing proteins accumulate in the cytoplasm, nucleus, or both, and interact with numerous transcription factors, changing patterns of expression of many genes. Eventually, polyQ accumulation leads to dysfunction machinery and to cell death. Both mechanisms can underlie this antagonistic pleiotropism of polyQs: increased expression of tumor-suppressor proteins/reduced expression of oncogenes, and/or increased apoptosis. Most of polyQ proteins are ubiquitously expressed, such as huntingtin (the protein related to HD) and ataxin 3 (related to SCA3/MJD), explaining why the protection against cancer would probably be general and nonspecific. While the tumour-suppressor P53 protein is highly expressed in patients with HD [20,21], no association has been reported between P53 expression and other polyQ diseases [11]. At this moment, the most reasonable hypothesis is that other mechanisms, such as apoptosis triggered by expanded polyQ tracts or altered neurotransmitter release, are involved [11].

PolyQ diseases and cancer are the effect of opposing cellular propensities: increased cell death (as in neurodegenerative diseases) versus decreased death of neoplastic cells that occurs in cancer. Pouladi & Hayden (2012) [22] illustrated very well the potential continuum between malignancies and

neurodegeneration with the example of cysteine-aspartic proteases (caspases). Increased activation of caspases leads to neuronal loss, whereas downregulation results in inappropriate cellular survival and growth, and ultimately leads to cancer. Considering the importance of caspases for several processes, including development, immunity, cellular remodelling, wound healing, neurite pruning, learning and memory, and programmed cell death, its activation needs a delicate balance, and other cellular pathways might have a similar pattern.

In conclusion, the association between polyQs and reduced risk for cancer, obtained from the present and other different populations, may help understanding of the evolutionary persistence of neurodegenerative diseases. Moreover, it can provide novel clues for the research and drug discoveries of both neurodegeneration and malignancy.

## 5. References

1	Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, et al. The gene for Machado–Joseph disease maps to human chromosome 14q. <i>Nature Genet</i> , 1993; 4: 300–304.
2	Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado–Joseph disease at chromosome 14q32.1. <i>Nature Genet</i> , 1994; 8: 221–227.
3	Saute AM, Jardim LB. Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment. <i>Exp Op Orph Drugs</i> , 2015.
4	Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). <i>Clin Genet</i> . 2007 Dec;72(6):543-5.
5	Costa MC, Paulson HL. Toward understanding Machado-Joseph disease. <i>Prog Neurobiol</i> . 2012 May;97(2):239-57.
6	Durr, Alexandra. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. <i>The Lancet Neurology</i> , ,2010 Volume 9 , Issue 9 885 – 894.
7	Robins C1, Conneely KN. Testing evolutionary models of senescence: traditional approaches and future directions. <i>Hum Genet</i> . 2014;133(12):1451-65.
8	Bajaj A, Driver JA, Schernhammer ES. Parkinson’s disease and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. <i>Cancer Causes Control</i> 2010; 21: 697–707.
9	Roe CM, Fitzpatrick AL, Xiong C, et al. Cancer linked to Alzheimer disease but not vascular dementia. <i>Neurology</i> 2010; 74: 106–12.
10	Sørensen SA, Fenger K, Olsen JH. Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: an apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? <i>Cancer</i> 1999; 86: 1342–46.



11	Ji J, Sundquist K, Sundquist J. Cancer incidence in patients with polyglutamine diseases: a population-based study in Sweden. <i>Lancet Oncol</i> 2012; 13: 642–48.
12	Turner MR, Goldacre R, Goldacre MJ. Reduced cancer incidence in Huntington's disease: record linkage study clue to an evolutionary trade-off? <i>Clin Genet</i> . 2013 Jun;83(6):588-90. Epub 2012 Sep 28.
13	Carter AJR and Nguyen AQ. Antagonistic pleiotropy as a widespread mechanism for the maintenance of polymorphic disease alleles <i>BMC Medical Genetics</i> 2011, 12:160.
14	Souza et al. Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph: segregation patterns and epidemiological factors influencing CAG instability. To submitted <i>Clinical Genetics</i> .
15	Lima M, Coutinho P, Abade A, Vasconcelos J, Mayer FM. Causes of death in Machado-Joseph disease: a case-control study in the Azores (Portugal). <i>Arch Neurol</i> . 1998 Oct;55(10):1341-4.
16	Schoenfeld M, Myers RH, Cupples LA, et al. Increased rate of suicide among patients with Huntington's disease. <i>J Neurol Neurosurg Psychiatry</i> 1984;47:1283-7.
17	Farrer LA. Suicide and attempted suicide in Huntington disease: implications for preclinical testing and persons at-risk. <i>Am J Med Genet</i> 1986;24:305-11.
18	Haines JL, Conneally PM. Causes of death in Huntington disease as reported on death certificates. <i>Genet Epidemiol</i> 1986;3:417-23.
19	Sørensen SA, Fenger K. Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. <i>J Med Genet</i> 1992; 29: 911-914.
20	Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, et al. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2000; 97: 6763–68.
21	Bae BI, Xu H, Igarashi S, et al. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. <i>Neuron</i> 2005; 47: 29–41.

22	Pouladi Mahmoud A, Hayden Michael R. Polyglutamine diseases and the risk of cancer. The Lancet/Oncology Vol 13 June 2012
----	--

## 5. List of Tables

Table 1 - Cumulative incidence of cancer in living individuals with SCA3/MJD and in unrelated controls

Table 2- General characteristics of SCA3/MJD and control deaths under study

Table 3- Characteristics of those individuals who died from cancer

**Table 1 - Cumulative incidence of cancer in living individuals with SCA3/MJD and in unrelated controls**

	Symptomatic SCA3/MJD individuals	Controls		p
N (males; %)	154 (68; 44.2%)	80 (27; 32.5%)		0.084
Age	45.67±12.2	46.06±13.2		0.821
Mean ± SD				
BMI	24.55±5.4	26.86±5.0		0.002
Mean ± SD				
Education (in years)				0.259
≤8 years	72 (46.8%)	29 (36.2%)		
≥8 to <12 years	60 (39%)	35 (43.8%)		
≥12 years	22 (14.3%)	16 (20%)		
Tobacco usage	62/154 (40.3%)	22/80 (27.5%)		$\chi^2=3.725$ ; p=0.054
Smoking history (pack-years)	8.41 ± 14.26	5.98 ± 14.28		p=0.081a
Mean ± SD				
Alcohol usage	26/154 (11.1%)	26/80 (32.5%)		$\chi^2=7.429$ ; p=0.006
Cumulative incidence of cancer in the last 15 years (%)	7 / 154 (4.5%)	5 / 80 (6.3%)	OR OR 0.71, IC 95% 0.22 to 2.32	$\chi^2=0.314$ ; p=0.575
Absolute risk reduction (ARR):	1.8			
Number of subjects needed	1,938	1,938		
Overall population in Rio Grande do Sul	625			

a-Mann-Whitney U test

**Table 2 – General characteristics of SCA3/MJD and control deaths under study**

	SCA3/MJD deaths		Control deaths		
N (males)	101 (53; 52.5%)		202 (106; 52.5%)		ns *
Age at death m ± sd	53.9 ± 15.06		53.92 ± 15.04		ns ***
CAGexp m ± sd (range)	76 ± 4.6 (64-91)				
Age at onset m ± sd (range)	32.6 ± 12 (7-55)				
DD m ± sd	17.62 ± 7				
Cancer as a cause of death	Yes	No	Yes	No	
	9 (8.9%)	92 (91.1%)	53 (26.2%)	149 (73.8)%	<0.001*
CAGexp m ± sd (range)	70.2 ± 3.8	76.5 ± 4.2			0.002**
Age at onset m ± sd (range)	44.6 ± 11.77	33.8 ± 12.8			0.025**
Age at death	67.8 ± 9.2	52.5 ± 14.85			0.003 **
DD m ± sd	21.4 ± 11.1	17.2 ± 6.4			ns **

\* chi-square

\*\* t test

\*\*\* Mann Whitney U Test

**Table 3 – Characteristics of those individuals who died from cancer**

	Cancer at death		
	SCA3/MJD cases	Controls	
N (males; percent)	9 (8; 88,8%)	53 (21; 39%)	ns *
Age at death	67.8 ± 9.27	56.3 ± 10.9	0.004 **
Most common types of cancer			
Breast cancer	0	5	
Uterine	0	4	
Colorectal	1	7	
Lung	0	6	
Stomach/esophagus	1	7	

\* chi-square

\*\* t test

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da instabilidade das expansões CAG durante transmissões meióticas com tendência a aumento destas expansões e consequente antecipação do início dos sintomas nas gerações seguintes, as PoliQ permanecem com uma frequência estável nas populações. Forças seletivas em favor deste traço dominante estariam atuando para compensar o efeito de seleção negativa devido à antecipação. Uma reduzida incidência de câncer poderia ser um destes efeitos em favor do traço dominante e já havia sido demonstrada para outras PoliQ, em especial para a doença de Huntington.

Em nosso estudo encontramos que o câncer foi uma causa menos frequente de óbito entre indivíduos com DMJ/SCA3 do que em controles não relacionados. Interessantemente, os pacientes com DMJ/SCA3 que faleceram por câncer apresentavam CAGexp menores do que os que faleceram por outras causas, ou seja, parece haver um efeito dose-resposta da “carga de poliQ” para a proteção ao câncer. Encontramos também uma tendência de redução da incidência cumulativa de câncer nos indivíduos sintomáticos vivos com DMJ/SCA3.

Diferente dos estudos anteriores com base em registros populacionais nossos dados sobre a incidência cumulativa de câncer nos indivíduos sintomáticos vivos com DMJ/SCA3 não atingiram significância estatística. A diferença absoluta na incidência cumulativa de câncer entre casos e controles foi de -1.8% e entre casos e a população de Porto Alegre no período foi de -1.5%. Realizamos cálculo de tamanho amostral após análise interina do estudo e os tamanhos amostrais necessários para termos poder suficiente para detectar uma diferença de incidências destas magnitudes (1,5 e 1,8%) seriam de mais de 1.800 indivíduos sintomáticos. Este número de pacientes é maior do que o número total de pacientes vivos com DMJ/SCA3 em nosso Estado, que foi atualizado durante esta dissertação, sendo atualmente de 625 indivíduos. Cabe ainda ressaltar que esta população de 625 indivíduos sintomáticos e de 2.708 indivíduos assintomáticos em pelo menos 25% de risco de desenvolver a doença é muito provavelmente a maior população de indivíduos com DMJ/SCA3 em números absolutos em uma única região mundial.

Nossos dados vão ao encontro dos dados já relatados para a DH e sugerem um efeito protetor comum das PoliQ contra a carcinogênese, por mecanismos ainda desconhecidos.

As PoliQ e o câncer estão em pólos opostos do ciclo celular: aumento da propensão a morte celular nas PoliQ (como nas doenças neurodegenerativas em geral) vs tendência a imortalidade e proliferação celular das células neoplásicas.

Alguns autores (POULADI & HAYDEN, 2012) já ilustraram bem o continuum entre malignidade e neurodegeneração ao estudarem proteases denominadas caspases. Enquanto um aumento da ativação das caspases levaria a morte neuronal, uma diminuição de sua ativação levava a alterações na sobrevivência, crescimento e divisão das células levando ao surgimento de células cancerígenas.

Em conclusão, a associação entre PoliQ e o reduzido risco de desenvolver câncer, obtidos no presente estudo e em outras populações pode auxiliar no entendimento da persistência evolucionária das doenças neurodegenerativas nas populações. Além disso, esta associação pode sugerir novas linhas de pesquisa com potencial inclusive para descoberta de novos fármacos tanto para doenças neurodegenerativas quanto para diferentes tipos de câncer.

## **7 PERSPECTIVAS**

Este trabalho foi a continuidade de uma linha do grupo de pesquisa em Neurogenética da UFRGS que avalia fatores que possam explicar a permanência evolutiva das PoliQ na população, a exemplo de trabalhos anteriores que mostraram uma fecundidade aumentada de mulheres com DMJ/SCA3 (PRESTES et al, 2007) e em recente levantamento do nosso grupo que demonstrou a distorção de segregação em favor do alelo mutado, com um risco de cerca de 65% de transmissão do alelo mutado e não de 50% como seria esperado pelo acaso (ANEXO E).

Temos ciência de que os dados gerados sobre câncer e DMJ/SCA3 apenas mostram uma associação (inversa) entre as condições e que são necessários estudos adicionais com delineamentos experimentais (modelos celulares ou em animais

transgênicos) para que possamos compreender melhor quais mecanismos celulares estão atuando no processo. Nossas conclusões enunciadas no artigo sinalizam nessa direção. Como em outras ocasiões, evidências epidemiológicas podem levar novas hipóteses de mecanismos não pensados apenas a partir dos dados experimentais.

Por outro lado, um possível temor levantado pelo nosso estudo e outros a ele semelhantes seria o de que futuros fármacos que consigam frear o processo de neurodegeneração possam aumentar o risco de carcinogênese, tanto por atuar diretamente em via celular relacionada a regulação do ciclo celular quanto por retirar o mecanismo protetor ao câncer que o processo neurodegenerativo poderia estar conferindo. Esse alerta é relevante que deverá auxiliar nos futuros desenhos de ensaios clínicos de segurança.

Cabe ressaltar que a redução da incidência do câncer seria um efeito colateral sistêmico comum das PoliQ e que isto indica que devem haver outros efeitos fora do sistema nervoso central/periférico nestas condições e que estes fenômenos podem ser importantes para um melhor entendimento destas condições e para o melhor cuidado dos pacientes, à exemplo do aumento da sensibilidade periférica à insulina na DMJ/SCA3 que pode estar relacionado a um efeito modificador do fenótipo da condição (SAUTE et al, 2011). Nossos dados sugerem, como seria esperado pelo fato da ataxina-3 e de algumas outras proteínas relacionadas as PoliQ serem ubíquas, que as PoliQ são de fato doenças multissistêmicas.

Finalmente, devo ressaltar que o nosso grupo pretende ainda descrever dados de morbi-mortalidade associados à DMJ/SCA3 e que foram levantados em simultâneo com a primeira parte do presente estudo. Acredito que revisar as principais causas de mortalidade na DMJ/SCA3 é um passo importante para alertar sobre cuidados que devem ser tomados a esses pacientes principalmente nas fases mais avançadas da doença, muitas vezes sendo cuidados pela própria família..



## 8. ANEXOS

## ANEXO A- Protocolo de Pesquisa - Câncer na Doença de Machado Joseph

<b>Questionário de Entrevista</b>		
Quem fez a entrevista? (nome e rubrica)	Caso V ( )	Controle VR ( )
	Controle VNR ( )	Data da entrevista: .../.../20....
NOME:		
Endereço:	Bairro:	
	Cidade:	
Escolaridade:	Sexo: F ( ) M ( )	
Telefone 1: ( )	Cidade e Estado de Nascimento:	DN: .../.../19....
Telefone 2: ( )		
Número da Família (se for caso)	Prontuário HCPA:	Idade atual:
<b>PERGUNTAS</b>		
Idade de início dos sintomas:	Idade de início da ataxia de marcha:	Anotar depois: CAGp/CAGg:
<b>Se for caso, revise/refaça o heredograma no verso:</b>		

**Se for caso: algum de seus parentes afetados pela doença de Machado Joseph faleceu do ano de 2000 em diante?**

Sim ( ) Não ( )

Se sim: anotar nomes aqui e no heredograma (casos Fa):

O sr/ A sra. teve ou tem diagnóstico de algum tipo de câncer/tumor, até hoje?

Sim ( ) Não ( )

(Se houver mais de um diagnóstico de câncer, fazer as perguntas relativas a cada câncer e anotar as respostas de forma individualizada/ por câncer. Se necessário, preencher em nova ficha)

Quando?

(ano ou idade ao diagnóstico)

19..... ou .....anos

20.....

Qual órgão ou tecido?

Pulmão ( )

Esôfago ( )

Intestino ( )

Endométrio ( )

Outro: qual?

Pele ( )

Estômago ( )

Mama ( )

Ovários ( )

Está em atividade? ("ainda tem este problema?") Sim ( ) Não ( )

Qual o tratamento empregado?

Cirurgias?

Fez biópsia?

Sim ( ) Não ( )

Em qual instituição fez a biópsia/diagnóstico?

Resultado da biópsia:

(pedir para nos enviar e anotar depois)

Este problema está em supervisão com algum médico ?

Sim ( ) Não ( )

Deseja que marquemos uma consulta para revisar este problema no HCPA?

Sim ( ) Não ( )

**Exposição à Fatores de Risco:**

Peso informado:

Altura informada:

IMC calculado:		
Tem o hábito de ingerir bebida alcoólica? Sim ( ) Não ( )		
Se sim:		
- quantos copos de vinho?		
Resposta:_____ copos por_____(dia ou semana)		
- quantas unidades de 300 ml de cerveja?		
Resposta:_____ unidades por_____(dia ou semana)		
- quantas doses de destilados?		
Resposta:_____ doses por_____(dia ou semana)		
Tem hábito de fumar? Sim ( ) Não ( )		
Se sim, desde quantos anos de vida?_____		
Quantos cigarros/dia, no último ano?_____		
Medicamentos em uso atual (e doses)		
Perguntar diretamente sobre o uso de: carbonato de lítio (Carbolithium®), ácido valpróico ou divalproato de sódio (Depakene®, Depakote®, Torval®), citalopram (Procimax®, Denyl®, Alcytam®, Citta®, Maxapram®), escitalopram (Lexapro®, Exodus®, Escilex®, Reconter®), carbamazepina (Tegretol®) e uso de outros antidepressivos (inibidores seletivos de receptação da serotonina: fluoxetina, sertralina, paroxetina) e fármacos como: buspirona, vareniclina (Champix®).		
1.		
2.		
3.		
4.		
Outras doenças em atividade;		
HAS	Sim ( )	Não ( )
Diabete Mérito	Sim ( )	Não ( )
Hipotireoidismo	Sim ( )	Não ( )
Outra: qual?		
<b>Para mulheres:</b>		
Faz autoexame de mama regularmente? Sim ( ) Não ( )		

Menopausa	Sim ( )	Não ( )
Idade: _____		
( ) Natural ( ) Cirúrgica		
Faz uso de reposição Hormonal?	Sim ( )	Não ( )
Teve filhos?	Sim ( )	Não ( )
Primeira gestação aos _____ anos de idade da informante		
Nº gestações: _____		
(a entrevistadora deve recordar à entrevistada de esta incluir eventuais abortos neste número) _____		
Última gestação aos _____ anos de idade da informante		



**ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CASOS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Projeto****CÂNCER NA DOENÇA DE MACHADO JOSEPH****INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS CONVIDADOS A PARTICIPAR DO ESTUDO  
(CASOS SINTOMÁTICOS).**

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal analisar se existe alguma relação entre a doença de Machado Joseph e a ocorrência de câncer. A intenção é a de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na doença de Machado Joseph e, talvez, buscar a aquisição de conhecimento que possibilite tanto um futuro tratamento eficaz para os pacientes afetados por esse problema de saúde, como também sobre as bases do câncer, em geral.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa, por ser portador da doença de Machado-Joseph.

**PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Sua participação envolverá uma ou duas entrevistas clínicas pessoais e/ou por telefone, nas quais aplicaremos um questionário de aproximadamente 15 minutos de duração. Elas somente serão realizadas se você autorizar a sua participação nesse estudo. Se você está sendo entrevistado em pessoa e se concordar em participar, vai entregar este documento assinado por si ou por seu representante legal.

Não faremos exame físico nem coleta de materiais biológicos (sangue, urina, etc). Além das respostas ao nosso questionário, podemos também pedir que você nos informe alguns dados sobre pessoas falecidas em sua família desde o ano 2000.

É ainda possível que nós peçamos informações adicionais como certidões de óbito, sumários de alta hospitalar e resultados de exames que confirmem o diagnóstico e

o tipo de câncer para aquelas pessoas que tiverem recebido um diagnóstico de câncer, no passado.

### **BENEFÍCIOS ASSOCIADOS À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

A participação no estudo não trará benefício direto ou imediato para a sua pessoa. Mas a pesquisa poderá ajudar a entender melhor os mecanismos relacionados à doença, e que eventualmente podem ter potenciais benefícios em relação a pesquisas para futuros tratamentos. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo.

### **CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS**

Os seus dados serão armazenados em um computador, para fins dessa pesquisa. Eles poderão ser utilizados para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização expressa para qualquer nova pesquisa para a qual cogitarmos em aproveitar suas informações. Por isso, ficaremos com seu endereço e telefone. Novos projetos de pesquisa que aparecerem no futuro também deverão obter aprovação prévia da Comissão de Ética Local (chamada de CEP HCPA) e, se necessário, da Comissão Nacional de Pesquisa (chamada de CONEP). E qualquer dúvida poderá entrar em contato com os responsáveis da pesquisa e com o comitê de ética em pesquisa do HCPA, os contatos constam ao final do termo de consentimento.

### **CONSENTIMENTO**

Você deseja participar deste estudo?      ( ) Sim      ( ) Não

Assinatura:.....

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

Data:...../...../.....

Nome por extenso (paciente ou responsável legal):

.....

Profissional

(Assinatura):.....

Nome por

extenso:.....

.....

Local:.....

Data:...../...../.....

Pesquisador Responsável: Dr<sup>a</sup> Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Gabriele Nunes Souza

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim,

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

### **Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa**

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

2o andar, sala 2227

Fone/Fax: 51 3359-7640

Atendimento das 8 às 17h, de segunda à sexta-feira.



## **ANEXO C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CONTROLES**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **Projeto**

#### **CÂNCER NA DOENÇA DE MACHADO JOSEPH**

#### **INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS CONVIDADOS A PARTICIPAR POR NÃO SEREM PORTADORES DA DOENÇA DE MACHADO JOSEPH**

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal analisar se existe alguma relação entre a doença de Machado Joseph e a ocorrência de câncer. A intenção é a de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na doença de Machado Joseph e, talvez, buscar a aquisição de conhecimento que possibilite tanto um futuro tratamento eficaz para os pacientes afetados por esse problema de saúde, como também sobre as bases do câncer, em geral.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa, por NÃO apresentar a doença de Machado-Joseph .

#### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Sua participação envolverá uma ou duas entrevistas clínicas pessoais e/ou por telefone, nas quais aplicaremos um questionário de aproximadamente 15 minutos de duração. Elas somente serão realizadas se você autorizar a sua participação nesse estudo. Se você está sendo entrevistado em pessoa e se concordar em participar, vai entregar este documento assinado por si ou por seu representante legal.

Não faremos exame físico nem coleta de materiais biológicos (sangue, urina, etc). Além das respostas ao nosso questionário, podemos também pedir que você nos informe alguns dados sobre pessoas falecidas em sua família desde o ano 2000.

É ainda possível que nós peçamos informações adicionais como certidões de óbito, sumários de alta hospitalar e resultados de exames patológicos daqueles indivíduos que tiverem recebido um diagnóstico de câncer, no passado.

### **BENEFÍCIOS ASSOCIADOS À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

A participação no estudo não trará benefício direto ou imediato para a sua pessoa. Mas a pesquisa poderá ajudar a entender melhor os mecanismos relacionados à doença, e que eventualmente podem ter potenciais benefícios em relação a pesquisas para futuros tratamentos. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo.

### **CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS**

Os seus dados serão armazenados em um computador, para fins dessa pesquisa. Eles poderão ser utilizados para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização expressa para qualquer nova pesquisa para a qual cogitarmos em aproveitar suas informações. Por isso, ficaremos com seu endereço e telefone. Novos projetos de pesquisa que aparecerem no futuro também deverão obter aprovação prévia da Comissão de Ética Local (chamada de CEP HCPA) e, se necessário, da Comissão Nacional de Pesquisa (chamada de CONEP). E qualquer dúvida poderá entrar em contato com os responsáveis da pesquisa e com o comitê de ética em pesquisa do HCPA, os contatos constam ao final do termo de consentimento.

### **CONSENTIMENTO**

Você deseja participar deste estudo?      ( ) Sim      ( ) Não  
deste TCLE.

Assinatura:.....

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

Data:...../...../.....

Nome por extenso (paciente ou responsável legal):

.....

Profissional

(Assinatura):.....

Nome por

extenso:.....

.....

Local:.....

Data:...../...../.....

Pesquisador Responsável: Dr<sup>a</sup> Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Gabriele Nunes Souza

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

### **Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa**

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

2o andar, sala 2227

Fone/Fax: 51 3359-7640

Atendimento das 8 às 17h, de segunda à sexta-feira.

## ANEXO D- ROTEIRO DA ENTREVISTA POR TELEFONE

### 1- Apresentação:

- Bom Dia/ Boa Tarde represento o grupo de pesquisa em neurogenética do Hospital de Clinicas de Porto Alegre, me chamo.....;

- Prezado Senhor (a), dirigimos a você para convidá-lo a participar da pesquisa intitulada Câncer na Doença de Machado Joseph.

Perguntar ao entrevistado: - Posso prosseguir:

Sim ( ) Não ( )

Se sim:

### 2- Convite para participar do Estudo

- Prezado Senhor (a) o presente estudo tem como objetivo geral, analisar se existe alguma relação entre a doença de Machado Joseph e a ocorrência de câncer. A intenção é a de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na doença de Machado Joseph e, talvez, buscar a aquisição de conhecimento que possibilite tanto um futuro tratamento eficaz para os pacientes afetados por esse problema de saúde, como também sobre as bases do câncer, em geral.

- Por isso precisamos entrevistar pessoas que possuem o diagnóstico DMJ/SCA3 e também seus familiares assintomáticos. E para podermos comparar se existe alguma relação entre câncer e DMJ/SCA3 precisamos também entrevistar pessoas que não possuem a doença para fazer parte do grupo controle.

- Não será preciso deslocar-se até o HCPA, não faremos exames físicos e coletas de exames, apenas responder ao nosso questionário, podemos também pedir que você nos informe alguns dados sobre pessoas falecidas em sua família desde o ano 2000. É ainda possível que nós peçamos informações adicionais como certidões de óbito, sumários de alta hospitalar e resultados de exames patológicos daqueles indivíduos que tiverem recebido um diagnóstico de câncer, no passado.

- A pesquisa tem como responsáveis Prof<sup>a</sup> Dra. Laura Bannach Jardim e aluna do mestrado Enf<sup>a</sup> Gabriele Nunes Souza.

- Sua participação do estudo será permanecer ao telefone para responder o questionário de perguntas (ANEXO A e B).

Entrevistado permaneceu ao telefone: ( ) Sim ( ) Não

Se sim, aplicar o questionário ( ) Caso o entrevistado não poder permanecer ao telefone, poderá ser agendado outro momento para entrevista para: Data:...../...../..... Horário:.....

Entrevistador:.....

**ANEXO E- Spinocerebellar ataxia tupe 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and epidemiological factors influencing CAG instability to be submitted Clinical Genetics**



**Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and epidemiological factors influencing CAG instability**

Journal:	<i>Clinical Genetics</i>
Manuscript ID	CGE-00752-2015
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	07-Nov-2015
Complete List of Authors:	<p>Souza, Gabriele; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas</p> <p>Kersting, Nathalia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas</p> <p>Krum-Santos, Ana; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina</p> <p>Santos, Amanda; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina</p> <p>Furtado, Gabriel; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular</p> <p>Pacheco, Daphne; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Serviço Social</p> <p>Gonçalves, Thomaz; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Enfermagem</p>
Key Words:	CAG expansion instabilities, CAG expansion transmission, Machado-Joseph disease, Minimal prevalence, MJD, Segregation distortion, SCA3, Spinocerebellar ataxia type 3

Gabriele N. Souza, Nathalia Kersting, Ana C, Krum-Santos , Amanda S.P. Santos, Gabriel V. Furtado, Daphne Pacheco, Thomaz A. Gonçalves, Jonas A.M. Saute, Lavínia Schuler-Faccini, Eduardo P. Mattos, Maria L. Saraiva-Pereira and Laura B. Jardim have no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

The author would like to thank all families and subjects who participated in this survey.

We are grateful to Raphael Castilhos for his help with Progeny training. This study was supported by FAPERGS (1209-2551/13-4), CNPq (402968/2012-3), and FIPE-HCPA (14-0204). ACKS was supported by FAPERGS. GNS, NK, ASPS, DP, TAG, GVF, EPM, LSF, MLSP, and LBJ were supported by CNPq.

### **Word count**

Abstract: 196

Total article (abstract, manuscript, figures, tables and references): 5,218 words.

Tables: 2; Figures: 3; References: 33.

### **Abstract**

Controversies about mendelian segregation and CAG expansion (CAGexp) instabilities during meiosis in Machado-Joseph disease (SCA3/MJD) need clarification. Additional evidence about these issues was obtained from the cohort of all SCA3/MJD individuals living in South Brazil. A survey was done to update information registered since 2001. Deaths were checked with the Public Information System, and data was made anonymous. Anticipation and delta-CAGexp from parent-offspring pairs, and delta-CAGexp between siblings were obtained. One hundred and fifty-nine families (94% of the entire registry) were retrieved, comprising 3,725 living individuals of 2015, 625 of these being symptomatic. Minimal prevalence was 6:100,000. Carriers of a CAGexp represented 65.6% of sibs in the genotyped offspring ( $p < 0.001$ ). Median instability was larger among paternal than maternal transmissions, and instabilities correlated with anticipation ( $r = 0.38$ ;  $p = 0.001$ ). Age of the parent correlated to delta-CAGexp among 115 direct parent-offspring CAGexp transmissions ( $\rho = 0.23$ ,  $p = 0.014$ ). In 98 additional kindreds, the delta-CAGexp between 269 siblings correlated with their delta of-age ( $\rho = 0.27$ ,  $p < 0.0001$ ). SCA3/MJD was associated with a segregation distortion favoring the expanded allele in our cohort. Instability of expansion during meiosis was weakly influenced by the age of the transmitting parent at the time of conception.

### **Key Words**

CAG expansion instabilities; CAG expansion transmission; Machado-Joseph disease; Minimal prevalence; MJD; Segregation distortion; SCA3; Spinocerebellar ataxia type 3

## 1. Introduction

Machado-Joseph disease or spinocerebellar ataxia type 3 (MJD/SCA3) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by an expansion of a (CAG)<sub>n</sub> repeat motif in the *ATXN3* gene [1, 2]. Normal alleles range from 12 to 44 CAG repeats, while expanded alleles (CAG<sub>exp</sub>) encode more than 51 repeats. The size of the expanded tract is inversely correlated with the age at onset and explains from 50 to 75% of its variance [3].

Although SCA3/MJD is clearly autosomal dominant, its pattern of inheritance presents several interesting phenomena that represent challenges to the understanding by formal genetics. For instance, segregation distortion – when chromosomes bearing the CAG<sub>exp</sub> are not in mendelian equilibrium in the offspring – has been formerly a matter of debate in SCA3/MJD [4, 5, 6, 7]. On the other hand, anticipation and meiotic instabilities of the CAG<sub>exp</sub> have been repeatedly documented in this disorder, although reasons for both events are not completely understood to date [4, 8, 9].

Expanded CAG repeats tend to show both meiotic and mitotic instabilities. Repeat size mosaicism has been observed in SCA3/MJD brains, reflecting the developmental pathways and cell composition of different central nervous system regions [10]. Somatic mosaicism is always less marked than gonadal mosaicism, and length of mutant alleles is unstable on transmission to successive generations. In polyQ disorders, where the expanded repeat is within the open reading frame, paternally transmitted alleles are more unstable than the maternal ones [4, 11, 12]. This phenomenon partly explains anticipation.

One of the first, most well-studied *cis*-acting factors was the repetitive motif itself [4, 9]. There is also some evidence that elements in *trans* may affect repeat instability, such as mismatch repair proteins, which are involved in the formation of slipped DNA strands [13]. A few studies on the effect of age at conception on meiotic instability raised conflicting results, maybe due to different sample sizes [4,9].

We described here our large cohort of SCA3/MJD patients and families from Rio Grande do Sul, Brazil. With this epidemiological data, our aims were to estimate the minimal prevalence and the segregation patterns of the transmitted alleles, and to correlate the observed CAG<sub>exp</sub> instabilities with distinct variables, such as gender, CAG<sub>exp</sub>, and age of the transmitting parent at the time of conception.

## 2. Methods

Family history, clinical and molecular data of all individuals with molecular diagnosis of SCA3/MJD, living in Rio Grande do Sul state, Brazil, were registered since 2001, and data were kept under protected files in our Institution. These data included information on pedigree relationships, gender, phenotype status, date of birth, age at death, age of onset of first symptom (AO) and CAG repeats length.

After review, a survey started in 2014, when personal interviews and telephone calls were done.

Subjects were invited to participate, and information was obtained from at least two individuals per family. After consent, the informant updated information related to changes in phenotypic status and to deaths in the family. Deaths were confirmed with the Public Information System on Mortality (SIM) of Rio Grande do Sul state, Brazil.

These data allowed us to build structured pedigrees and to estimate age of the affected parent at the time of conception. All pedigrees started with the oldest ancestor known to be affected. Spouses were not included; therefore, the sum of members of all SCA3/MJD families was equal to all affected individuals plus those at 50%, 25%, and 12.5% risk.

Results from asymptomatic individuals who were engaged in our pre-symptomatic testing program [14] were added in the database by only one author (LBJ). After that, all database was made anonymous: individual and family identifications were coded again in order to ensure the confidentiality of all subjects and families.

This study was nested into a larger survey, registered as CAAE 7798214.0.0000.5327, and approved by the Ethics Committee (EC) from the Institution at which the work was performed – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – which follows the Code of ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and the standards established by the author's Institutional Review Board and funding agency. We have obtained written informed consent from all participants.

Anonymous data on molecular results was obtained retrospectively, which discharges the authors from obtaining EC approval. Anticipation was considered the difference between AO of the transmitting parent and AO of the child. This delta-AO was zero when both the affected parent and child had the same AO. Cases of anticipation were defined when delta-AO was equal or greater than 1.

Similarly, cases of later onset of the disease in the offspring were defined when delta-AO was equal or less than -1. Likewise, stability of CAGexp transmission was estimated using CAGexp lengths of both parent and child. Stable transmission was defined by delta-CAGexp equal to zero; i.e., both affected parent and carrier child show a CAGexp of the same length. Cases of intergenerational expansion were defined by delta-CAGexp equal or greater than 1, while contractions were defined by delta-CAGexp equal or less than -1.

In kindreds where CAGexp was available for at least two sibs, but not for the transmitting parent, the potential effect of age of the parent on transmission instability was tested by correlating delta-CAGexp between siblings (delta-CAGexp-sibs) to their age difference (delta-of-age-sibs), assuming the older sibling as the reference for a given kindred. Variables AO, delta-AO, CAGexp, and delta-CAGexp were described as mean  $\pm$  standard deviation (range). Since most variables did not show normal distribution, nonparametric tests, such as Mann-Whitney, Spearman



and Kruskal-Wallis, were applied. This was an exploratory study, and the chosen  $p$  was 0.05.

All data were computed into Excel files and pedigrees were built using Progeny® software. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.18 was used for statistical analyses.

### 3. Results

One hundred and seventy eight SCA3/MJD families were registered in Rio Grande do Sul, Brazil, as of April 2015. Data on 4,837 subjects (2,237 male, 2,297 female, 247 undetermined) were included, and 1,350 (28%) were symptomatic individuals. One hundred and fifty nine families (90%), comprising 4,544 individuals (94% of the overall data set), were retrieved by the survey; most of them included subjects under care in our outpatients clinics. The remaining 18 families - including 293 individuals - were not found and were considered as missing cases to follow up, after at least four attempts of contact.

The 159 families under study comprised 3,725 living individuals as of June-September 2015, 625 of them being symptomatic. Since the local population comprises 11,2 million inhabitants, the estimated minimal prevalence is of 5.6:100,000 (considering all 178 families, this rate would equal 6.15:100,000).

Pre-symptomatic testing was performed for 162 asymptomatic individuals; when those were excluded, 1,772 and 936 individuals were at 50% and 25% risk, respectively, of carrying the expanded repeat among the asymptomatic, non-tested subjects.

Molecular data was obtained for 463 symptomatic and 162 individuals at 50% risk who asked for pre-symptomatic testing (PT). The latter were composed by 104 non-carriers and 57 carriers of the CAG<sub>exp</sub>. Molecular data on all 520 heterozygotes – 463 symptomatic and 57 asymptomatic individuals - are presented in Table 1. No gender effect was observed. AO and CAG<sub>exp</sub> correlated with a  $\rho = -0.798$  ( $p = 0.0001$ , Spearman) (Figure 1).

#### 3.1 Segregation patterns

In 55 sibships all children were genotyped, comprising 27 singletons and 28 sibships with 2 or more siblings. After excluding the 27 singletons, the remaining 28 sibships comprised 72 children: 48 (67%) were carriers and 24 (33%), non-carriers of CAG<sub>exp</sub> ( $p = 0.03$ ) (Table 2).

In other 49 sibships all but one children were genotyped, comprising 146 additional subjects. In order to increase sample size for segregation analysis, arbitrary genotypes (ag) were assigned to the 49 non-genotyped subjects according to mendelian segregation patterns; i.e., 24 were designated as carriers and 25 as

non-carriers of a CAGexp tract. In this sense, the 146 individuals from these 49 sibships would be distributed as follows: 26 non-carriers, 71 carriers, 24 ag non-carriers and 25 ag carriers.

Adding these sibships to the 28 genotyped sibships, sample size increased to 218 children: 143 (65.6%) carriers and 75 (34.4%) non-carriers ( $p = 0.001$ ). Distributions were the same according to the gender of the affected parent (chi-square ns) (Table 2).

### 3.2 CAGexp transmissions and anticipation of age at onset

One hundred and fifteen CAGexp transmissions (38 paternal and 77 maternal) were followed in this current study. The child-parent median (SEM; range) of delta-CAGexp was 1 (0.23; -5 to 9). Median instability was larger among paternal than among maternal transmissions: 3 (0.53; -5 to 9) versus 1 (0.21; -5 to 7) ( $p = 0.0001$ , Mann-Whitney U, Figure 2A). Considering only the symptomatic children at the time of this analysis, the child-parent delta-CAGexp increased by two repeat units (0.29; -5 to 9).

Delta-AO (i.e., anticipation) was obtained for 206 transmissions (75 paternal) and normal distribution was observed. Mean  $\pm$  SD (range) of the overall delta-AO was  $7.32 \pm 9.7$  (-19 to 35) years. The gender of the transmitting parent did not seem to matter: delta-AO from fathers was  $7.64 \pm 10$  years, as compared to  $7.12 \pm 9.4$  years for mothers (ns, t test) (Figure 2B).

There were 74 affected parent-child pairs for whom both anticipation and molecular data were available. Anticipation is shown plotted against variation in repeat length (Figure 2C). A weak correlation between change in parent-offspring repeat length and anticipation was noted ( $r = 0.38$ ;  $P = 0.001$ ).

### 3.3 Factors that could influence CAGexp instabilities

The potential effect of the age of the transmitting parent at the time of the carrier's conception on the CAGexp instability was tested in two ways. As mentioned before, 115 CAGexp transmissions were followed. Since the date of birth of all individuals in this setting was available, the age of the affected parent at the time of conception was known, and it showed a weak correlation with the delta-CAGexp ( $\rho = 0.23$ ,  $p = 0.014$ , Spearman, Figure 3A).

This correlation was still present when only the female transmitting parents were included (77 transmissions;  $\rho = 0.25$ ,  $p = 0.031$ , Spearman); however this correlation disappeared when male transmissions were solely considered.

For the remaining 98 kindreds among whom CAGexp of the transmitting parent was not available, the potential effect of age of the parent on transmission instability was tested by correlating delta-CAGexp-sibs with delta-of-age-sibs.

One hundred and seventy one pairs of siblings were then studied: the difference in number of years between the birth of each sib (delta-of-age-sibs) showed a weak correlation with the delta-CAGexp-sibs ( $\rho = 0.27$ ,  $p < 0.0001$ , Spearman, Figure 3B). This association was slightly stronger in children of affected mothers (94 sib pairs;  $\rho = 0.329$ ,  $p = 0.002$ , Spearman) than in those of affected fathers (77 sib pairs;  $\rho = 0.235$ ,  $p = 0.051$ ) (Figures 3C and 3D).

Finally, the potential effect of the CAG length of the expanded allele of the transmitting parent on further instability at *ATXN3* on the offspring was also tested but we did not find any significant result in our cohort (data not shown).

#### 4. Discussion

Our results confirmed that the expanded CAG tract in the *ATXN3* gene is very unstable during meiosis. Moreover, our data showed that SCA3/MJD is associated with a segregation distortion favoring the expanded allele. Further, expansion instability during meiosis seemed to be influenced by the age of the transmitting parent at the time of conception.

We took advantage of following a large cohort of SCA3/MJD families, by both reviewing data retrieved during a long period in a clinical setting and interviewing families during an interval of one year.

By doing that, we updated the minimal prevalence of this disease in Rio Grande do Sul, Brazil, as affecting 6:100,000 inhabitants. Formal cross-sectional studies designed to define the true prevalence of rare diseases are hard to be performed. Moreover, the probability of not retrieving carriers would turn conventional cross-sectional studies prone to beta errors.

Former estimates of minimal prevalence in our state provided lower numbers than the present one [15,16]. Since all of them have been obtained from a convenience sample of increasing size, it is possible (although unlikely) that the true prevalence is even higher.

This large data set allowed us to describe segregation patterns and to follow a large number of CAGexp transmissions. Twenty-eight non-singleton offsprings were genotyped, and we found that 67% of siblings were carriers in this group. In order to increase sample size and to reduce the possibility of a recruiting bias favoring sibships at higher risk, we decided to add to this data set those offsprings where only one sibling was not tested, attributing a 50% risk to the non-tested individuals.

The obtained proportion of carriers in this case was again of 65%, which is significantly higher than the *a priori* risk predicted by a Mendelian segregation pattern. This segregation bias was observed both in paternal and maternal transmissions. Former studies on allele segregation in SCA3/MJD, based on phenotypes of individuals older than 45 years of age, raised contradictory results [6, 7].

Genotype-based studies similar to ours are scarce: their data were in favor of a non-random segregation [4, 17, 18]. However, discrepancies are still present. For instance, among 80 SCA3/MJD transmissions observed by Ikeuchi and colleagues, the non-mendelian segregation was observed among the offspring of male CAGexp carriers only [17]. Sperm analysis from carriers of CAGexp also revealed conflicting results: mendelian segregation was seen in Dentato-Rubro-Pallidum-Luysian Atrophy (DRPLA) [19], while segregation distortion in favor of the expanded allele was observed in SCA3/MJD [5].

On top of that, previous data showed that microsatellite expansions seemed to be prone to non-random segregation [20]. Our results agree with most of these studies [5, 6, 18] and suggest that the presence of an expansion grants a selective advantage to the cell lineage. The advantage seemed to occur independently from the parental gender. New mutations or several ancestral haplotypes have never been documented, and the expanded alleles lost at each generation in severe, early onset SCA3/MJD cases with no offspring do not match with the limited set of known ancestral haplotypes.

Actually, the worldwide association of SCA3/MJD to a limited set of ancestors [21] suggests that the maintenance of this set of expanded alleles is at least to a certain extent due to some selective advantage. Non-random segregation could be one of these selection factors.

We were also able to follow a great number of CAGexp transmissions, and to test whether gender, age, and CAGexp of the transmitting parent could influence transmission instabilities. The lack of correlation between CAGexp of the parent and the degree of instability seen in the present cohort confirmed former reports [4, 8].

Association between paternal transmissions and larger instabilities was observed in SCA3/MJD in previous studies [4, 8] as well as in other polyQ pathologies, such as Huntington's disease (HD) [22], DRPLA [23], and SCA1 [24]. In contrast, larger instabilities in maternal transmission were documented for other expanded repeats, such as the intronic GAA in Friedreich's Ataxia (FRDA) [25], and the non-transcribed CTG expansions in Myotonic Dystrophy [26] and CTA-CTG expansions in SCA8 [27]. In our cohort, although instabilities were larger in alleles inherited from male transmissions, they were also observed in female transmissions, with a clear trend for an even further expanded CAGexp. By all means, this can be an observation bias in favor of pairing more severe offspring with less severe parents [8].

This bias was evident when only affected offspring and their parents were included. Our time span as observers and the time-frame during prospective cohorts by themselves produce recruiting biases. Observation of all transmissions in several pedigrees would enlighten this matter. Nonetheless this type of study is not achievable at this time. A long-term cohort, including more than one generation period of observation, could help to confirm this current finding. Nevertheless, even if the trend towards an increased CAG<sub>exp</sub> is not correct, instabilities do occur in both maternal and paternal meiosis. Then, common mechanisms to both germinative lineages should be operating.

Anticipation is a well-known phenomenon in SCA3/MJD [8], being mostly explained by a tendency for repeats to expand during vertical transmission and by AO to be inversely correlated to repeat length. Anticipation showed a weak correlation with the parent-child delta-CAG, at least in our cohort. Our data showed that anticipation was equally severe among maternal and paternal descents. Although recruiting bias should be taken into account [8], both of our findings suggest that factors independent from the CAG instability and from the parental gender influence anticipation.

Finally, the results presented here suggest that the age of a SCA3/MJD carrier slightly influence instability of the transmitted CAG<sub>exp</sub> allele towards further expansion. Two strategies were applied here to look for this association, and in both cases the correlations found were weak and of the same magnitude. The rho between delta-CAG<sub>exp</sub> and age of the parent at the time of conception was 0.23, and between the delta-CAG-sibs and difference in years between births of siblings was 0.27. Association studies comparing parental age and instability degree of expanded repeats are limited.

Negative results were described for HD [28] and SCA3/MJD [4], while positive associations were also seen in SCA3/MJD [9] as well as in FRDA [25]. Martins and colleagues [9] described a significant correlation between age of the father and magnitude of expansion, considering only expansions of two or more CAG repeats.

They studied 42 father- and 58 mother-offspring CAG<sub>exp</sub> transmissions in SCA3/MJD. Their findings showed that the age of mothers did not present any effect on CAG<sub>exp</sub> transmissions, in contrast to fathers. Our weak rhos of 0.23 to 0.33 were observed among 115 direct and 171 indirect transmissions. It remains possible that the present correlations would not be found in smaller cohorts and suggest that previous divergent results could be at least partially related to sample size.

We have seen that the effect of age on the magnitude of expansion, although weak, occurred in both genders, and, surprisingly, was more evident among mothers than fathers. Maternal age effects on mutation rates or on increased microsatellite instabilities have been reported in FRDA [25], in Fragile X Syndrome (FMR1) [29] and in mitochondrial disorders [30]. The effect of age on oogenesis cannot be attributed to a high number of mitotic divisions as in spermatogenesis, since at the time of birth germ cells in the developing ovary have already completed their proliferative phase.

Given that all postnatal phases of germ cell development are meiotic, maternal mutagenic events involve mostly recombination-related mechanisms [31]. An age-dependent process related to repair of DNA damage mutations might be operating independently from germ line mitotic divisions in SCA3/MJD.

Previous studies have shown that larger CAG expansions were found in postmeiotic germ cells in HD, suggesting that expansions continue to occur during meiosis, and/or after meiosis is complete, in which other events such as recombination, gene conversion or postmeiotic genome maintenance may be involved [32]. Recently, variants in the *ERCC6*, *RPA3*, and *CDK 7* genes were associated with an expansion bias of SCA3/MJD alleles; these three transcripts have been linked to transcription-coupled repair [33]. A role of CAGexp on postmeiotic genome maintenance is an attractive hypothesis, especially in oocytes, and could be in line with our results.

In conclusion, we have shown that the CAGexp transmission was very unstable in the present SCA3/MJD cohort, being favored by a non-random segregation. In addition, the older the carrier, the larger were the CAGexp transmitted, regardless of being maternally or paternally transmitted. Since both findings were preceded by controversial data, they should be confirmed in an independent cohort.

## 5. References

1	Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, et al. The gene for Machado–Joseph disease maps to human chromosome 14q. <i>Nature Genet</i> , 1993; 4: 300–04.
2	Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado–Joseph disease at chromosome 14q32.1. <i>Nature Genet</i> , 1994; 8:221–227.
3	Saute AM, Jardim LB. Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment. <i>Exp Op Orph Drugs</i> , 2015. Doi:10.1517/21678707.2015.1025747
4	Dürr A, Stevanin G, Cancel G, et al. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. <i>Ann Neurol</i> .1996;39(4):490-9.
5	Takiyama Y, Sakoel K, Soutome M, et al. Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for Machado–Joseph disease (MJD1): evidence for non-Mendelian transmission of the MJD1 gene and for the effect of the intragenic CGG/GGG polymorphism on the intergenerational instability. <i>Human Molecular Genetics</i> 1997; 6(7):1063-8.
6	Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Machado–Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. <i>Acta Neurol Scand</i> 2001a; 104: 224–231
7	Bettencourt C, Fialho RN, Santos C, et al. Segregation distortion of wild-type alleles at the Machado-Joseph disease locus: a study in normal families from the Azores islands (Portugal). <i>J Hum Genet</i> 2008; 53:333–339.
8	Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. <i>Am J Hum Genet</i> . 1995; 57(1): 54-61.
9	Martins S., Coutinho P. Silveira I, et al. Cis-Acting Factors Promoting the CAG Intergenerational Instability in Machado–Joseph Disease. <i>Am J Med Genet Part</i>
10	Lopes-Cendes I, Maciel P, Kish S, et al. Somatic mosaicism in the central nervous system in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph

11	Sasaki H, Wakisaka A, Fukazawa T, et al. CAG repeat expansion of Machado-Joseph disease in the Japanese: analysis of the repeat instability for parental transmission, and correlation with disease phenotype. <i>J Neurol Sci.</i> 1995;133(1-2): 128-33.
12	Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G, et al. Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado–Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome:implication for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. <i>Hum. Mol. Genet</i> 1996; 5: 923–932.
13	Panigrahi GB, Lau R, Montgomery SE, Leonard MR, Pearson CE. Slipped (CTG)*(CAG) repeats can be correctly repaired, escape repair or undergo error-prone repair. <i>Nat Struct Mol Biol</i> 2005; 12:654–662.
14	Schuler-Faccini L, Osorio CM, Romariz F, Paneque M, Sequeiros J, Jardim LB. Genetic counseling and presymptomatic testing programs for Machado-Joseph Disease: lessons from Brazil and Portugal. <i>Genet Mol Biol.</i> 2014; 37(1 Suppl): 263-70.
15	Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, et al. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil – 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease–causing mutations. <i>J Neurol.</i> 2001b; 248 : 870–876.
16	Prestes PR, Saraiva-Pereira ML,Silveira I, Sequeiros J, Jardim LB. Machado-Joseph Disease Enhances Genetic Fitness: A Comparison Between Affected and Unaffected Women and Between MJD and the General Population. <i>Annals of Human Genetics</i> 2008; 72: 57–64.
17	Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y, et al. Non-Mendelian transmission in dentatorubral-pallidolusian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. <i>Am J Hum Genet.</i> 1996; 58(4): 730-3.
18	Riess O,Epplen JT, Amoiridis G, Przuntek H, Schöls L.Transmission distortion of the mutant alleles in spinocerebellar ataxia. <i>Hum Genet.</i> 1997; 99: 282–284.
19	Takiyama Y, Sakoe K, Amaike M, et al. Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA): the instability of the CAG repeats in the DRPLA gene is prominent among the CAG repeat diseases. <i>Hum Mol Genet.</i> 1999; 8(3): 453-7.
20	Magee AC, Hughes AE. Segregation distortion in myotonic dystrophy. <i>J Med Genet</i> 1998; 35:1045-1046.



21	Martins S, Calafell F, Gaspar C, et al. Asian origin for the worldwide spread mutational event in Machado-Joseph disease. <i>Arch Neurol</i> 2007; 64:1502–1508.
22	Telenius H, Almqvist E, Kremer B, et al. Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG) <sub>n</sub> changes in Huntington disease. <i>Hum Mol Genet.</i> 1995; 4(2):189-95.
23	Ikeuchi T, Onodera O, Oyake M, Koide R, Tanaka H, Tsuji S. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA): close correlation of CAG repeat expansions with the wide spectrum of clinical presentations and prominent anticipation. <i>Semin Cell Biol.</i> 1995; 6(1): 37-44.
24	Dubourg O, Dürr A, Cancel G, et al. Analysis of the SCA1 CAG repeat in a large number of families with dominant ataxia: clinical and molecular correlations. <i>Ann Neurol.</i> 1995; 37(2): 176-80.
25	De Michele G, Cavalcanti F, Criscuolo C, et al. Parental gender, age at birth and expansion length influence GAA repeat intergenerational instability in the X25 gene: pedigree studies and analysis of sperm from patients with Friedreich's ataxia. <i>Hum Mol Genet.</i> 1998; 7(12): 1901-6.
26	Dean NL, Tan SL, Ao A. Instability in the transmission of the myotonic dystrophy CTG repeat in human oocytes and preimplantation embryos. <i>Fertil Steril.</i> 2006; 86(1): 98-105.
27	Ayhan F, Ikeda Y, Dalton JC, Day JW, Ranum LPW. Spinocerebellar Ataxia Type 8. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. <i>GeneReviews</i> ® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. 2001 Nov 27 [updated 2014 Apr]
28	Wheeler VC, Persichetti F, McNeil SM, et al. Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. <i>J Med Genet.</i> 2007; 44(11): 695-701.
29	Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. <i>J Neurodev Disord.</i> 2014; 6(1): 24.
30	Rebolledo-Jaramillo B, Su MS, Stoler N, et al. Maternal age effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2014; 111(43): 15474-9.
31	Goriely A, Wilkie AO. Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. <i>Am J Hum Genet.</i> 2012; 90(2): 175-200.
32	Yoon SR, Dubeau L, de Young M, Wexler NS, Arnheim N. Huntington disease expansion mutations in humans can occur before meiosis is completed. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2003; 100: 8834–8838.

33	Martins S, Pearson CE, Coutinho P, et al. Modifiers of (CAG)(n) instability in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3) transmissions: an association study with DNA replication, repair and recombination genes. Hum Genet. 2014; 133(10):1311-8.
----	---

## 6. List of Tables

Table 1 – Clinical and Molecular Data of the 520 carriers of CAGexp in *ATXN3* from Rio Grande do Sul, Brazil, as of September 2015.

Table 2 – Distribution of genotypes among completely genotyped sibships and when only one non-genotyped sib was allowed, receiving an a priori genotypic status (50- 50%). Singletons were not included.

## 7. List of Figures

Figure 1 – Correlation between age at onset and CAGexp in the present cohort of symptomatic SCA3/MJD individuals.

Figure 2 – Patterns of transmission. (A) Deltas of the CAGexp between child and parent. (B) Deltas of the ages at onset between child and parent, i.e., anticipations. (C) Correlation between delta CAGexp child-parent and anticipations.

Figure 3 – The effect of the age of the transmitting parent by the time of conception. (A) Correlation between the age of the affected parent by the time of conception and delta CAGexp child-parent. (B) Correlation between years between birth of sibs and delta CAGexp between sibs. (C) Correlation between years between birth of sibs and delta CAGexp between sibs; female transmissions. (D) Correlation between years between birth of sibs and delta CAGexp between sibs; male transmissions.

**Table 1 – Clinical and Molecular Data of the 520 carriers of CAGexp at ATXN3 from Rio Grande do Sul, Brazil, up to September 2015**

	All	Phenotypic status		
		Symptomatic	Asymptomatic	
N	520	463	57	
Females/Males	278/241	246 / 216	32 / 25	
CAG repeat length, normal allele	21.8 ± 5.2  (14-38)	21.8 ± 5.2  (14-38)	21.5 ± 5.6  (14-32)	ns
CAG repeat length, expanded allele	75 ± 3.6  (65-91)	75.1 ± 3.6  (65-91)	73.9 ± 2.9  (68-84)	0.013  *
Age at onset of symptoms, for symptomatic individuals,  or  Age at DNA collection, for asymptomatic individuals.		34.3 ± 11.2  (5-59)	33.3 ± 9.5  (19-54)	ns **

**Table 2 – Distribution of genotypes among sibships completely genotyped and when only one non-genotyped sib was allowed, receiving an a priori genotypic status (50-50%). Singletons were not included.**

	Sibships completely genotyped		Sibships where only one non-genotyped sib was allowed, receiving an a priori (50-50%) genotypic status		
	28		77		
	Observed	Expected	Observed		Expected
With	48 (67%)	36 (50%)	143 (65.6%)		109 (50%)
Without	24 (33%)	36 (50%)	75 (34.4%)		109 (50%)
Overall	72 (100%)		218 (100%)		
Chi-	4.14		11.5		
			Male parent	Female parent	
			95	123	
With			59 (62%)	88 (72%)	
Without			36 (38%)	35 (28%)	
Chi-square			2.46 (ns) *		

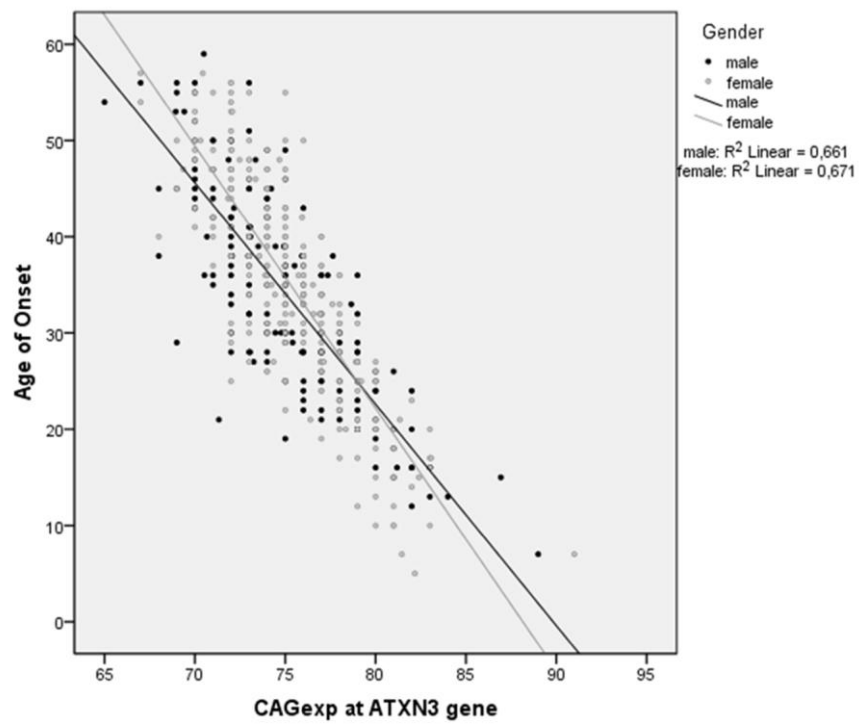


Figure 1 – Correlation between age at onset and CAGexp in the present cohort of symptomatic SCA3/MJD individuals. 254x190mm (96 x 96 DPI)

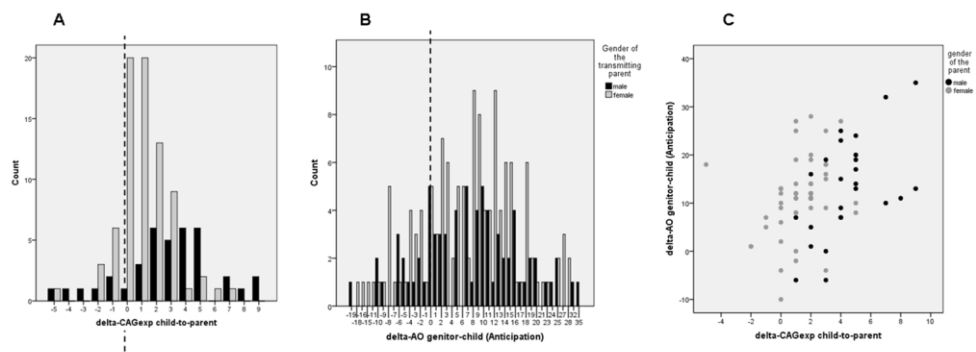


Figure 2 – Patterns of transmission. (A) Deltas of the CAGexp between child and parent. (B) Deltas of the ages at onset between child and parent, ie, anticipations. (C) Correlation between delta CAGexp child-parent and anticipations.

379x139mm (96 x 96 DPI)

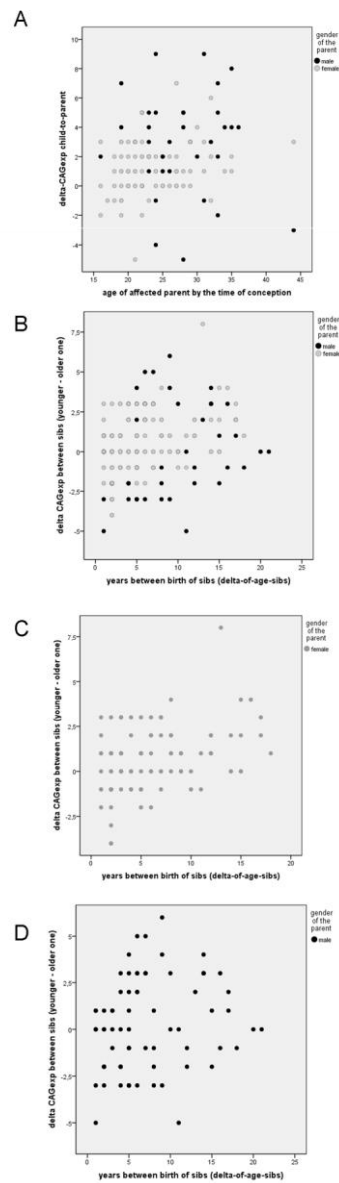


Figure 3 – The effect of the age of the transmitting parent by the time of conception. (A) correlation between the age of the affected parent by the time of conception and delta CAGexp child-parent. (B) Correlation between years between birth of sibs and dela CAGexp between sibs. (C) Correlation between years between birth of sibs and dela CAGexp between sibs; female transmissions. (D) Correlation between years between birth of sibs and dela CAGexp between sibs; male transmissions. 288x876mm (89 x 89 DPI)