



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sara Alexandra Nascimento Costa e Pires Martins

IMPACTO DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO  
ÚNICO EM GENES ASSOCIADOS A DOENÇAS DE  
POLIGLUTAMINAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE  
TERAPIAS GÉNICAS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica  
orientada pelo Doutor Rui Jorge Nobre e pelo Professor Doutor Luís  
Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia  
da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sara Alexandra Nascimento Costa e Pires Martins

**IMPACTO DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO  
EM GENES ASSOCIADOS A DOENÇAS DE  
POLIGLUTAMINAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE  
TERAPIAS GÉNICAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica orientada pelo Doutor Rui Jorge Nobre e pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021



## **Agradecimentos**

Ao chegar ao fim de mais uma etapa, não podia deixar de agradecer a todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida pela oportunidade de poder integrar este projeto e nele evoluir ao longo deste último ano.

Ao Doutor Rui Nobre, pela sua orientação e disponibilidade em acompanhar este projeto, e pelos seus ensinamentos ao longo desta caminhada.

À Doutora Magda Santana, que me acompanhou ao longo deste Mestrado. Pelo seu cuidado e disponibilidade. Pelos seus ensinamentos, depois de um dia de trabalho, no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, obrigada.

Aos meus amigos e à minha família pelo seu carinho, apoio, e por me incentivarem sempre a abraçar novos desafios.

À Isa, que iniciou este desafio comigo, pela sua serenidade que me faz colocar os pés no chão. Pela amizade, o apoio, os jantares; pela sua presença diária e pelo seu carinho. Depois disto, sabemos o que nos espera.

À Sofia, pela sua ajuda, que me mostra sempre que tudo tem uma solução, tranquilizando-me com palavras positivas e com a sua gargalhada.

À Patrícia, à Rita e à Mariana, as minha companheiras, que me aturam todos os dias, ouvem as minhas frustrações, que me fazem rir e me apoiam diariamente.

À Renata e ao Rafael, que, neste ano desafiante, me apoiaram como dois irmãos. Sempre presentes, com uma palavra amiga. Pelos jantares de sexta/sábado que me fizeram desanuviar a cabeça quando estava a precisar e que diariamente proporcionam momentos inesquecíveis.

Ao Artur, o meu companheiro de todos os dias, sem o qual, nada disto seria possível. Que me incentivou a abraçar este Mestrado, desde o primeiro dia. Pelo seu carinho e cuidado neste caminho. Ainda que tenha que entender que chorar também possa fazer parte, acaba sempre por me mostrar que tudo é possível, obrigada.



# Índice

Índice de Tabelas.....	iii
Índice de Figuras.....	iii
Lista de Abreviaturas .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
1. Doenças de poliglutaminas .....	1
1.1. Doença de Huntington .....	2
1.2. Atrofia Muscular Bulboespinal .....	6
1.3. Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana .....	7
1.4. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 1 .....	9
1.5. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2 .....	10
1.6. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3 .....	12
1.7. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 6 .....	14
1.8. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 7 .....	15
1.9. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 17 .....	17
2. Genes e Polimorfismos genéticos nas Doenças de Poliglutaminas .....	18
2.1. Doença de Huntington .....	19
2.2. Atrofia Muscular Bulboespinal .....	27
2.3. Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana .....	28
2.4. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 1 .....	31
2.5. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2 .....	32
2.6. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3 .....	33
2.7. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 6 .....	34
2.8. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 7 .....	36
2.9. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 17 .....	37
3. Terapias de silenciamento alelo específicas nas doenças de poliglutaminas .....	37
3.1. Doença de Huntington .....	37
3.2. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 1 .....	43
3.3. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3 .....	43
3.4. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 7 .....	46
Conclusão.....	47
Bibliografia .....	48



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> -Descrição das características genéticas, fenotípicas e manifestações clínicas das doenças de poliglutaminas .....	5
<b>Tabela 2</b> -Polimorfismos de nucleótido único associados às expansões de CAGs, na Doença de Huntington.....	21
<b>Tabela 3</b> - Haplótipos descritos para a Doença de Huntington.....	25
<b>Tabela 4</b> - Polimorfismos de nucleótido único associados às expansões de CAGs, na DRPLA, SCA1 e SCA2 .....	30
<b>Tabela 5</b> - Polimorfismos de nucleótido único associados às expansões de CAGs, na SCA3 e SCA7.....	35
<b>Tabela 6</b> - Polimorfismos de nucleótido único identificados na doença de Huntington e a sua aplicação em abordagens alelo específicas .....	42
<b>Tabela 7</b> - Polimorfismos de nucleótido único identificados nas Ataxias Espinocerebelosas e a sua aplicação em abordagens alelo específicas.....	45

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Localização dos polimorfismos de nucleótido único nas doenças de poliglutaminas .....	26
---	----



## Lista de Abreviaturas

**A** - Adenina

**AAV** - Vírus adenoassociados

**AR** - Recetor de androgénio

**ASO** - Oligonucleótido antisense

**ATNI** - Atrofina-1

**ATXN1** - Ataxina-1

**ATXN2** - Ataxina-2

**ATXN3** - Ataxina-3

**ATXN7** - Ataxina-7

**C** - Citosina

**Cas9** - Proteína associada a CRISPR 9

**Ca<sub>v</sub>2.1** - Subunidade  $\alpha$ 1A

**cDNA** - DNA complementar

**CRISPR** - Repetições Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DRPLA** - Atrofia dentato-rubro pálido-luisiana

**DUB** - Desubiquitinação

**G** - Guanina

**HAT** - Histona acetil-transferase

**HBPI** - Fator de transcrição I da caixa do grupo de alta mobilidade

**HD** - Doença de Huntington

**HTT** - Huntingtina

**LSm** - Domínio Like Sm

**LSmAD** - Domínios associados a LSm

**MJD** - Doença de Machado-Joseph

**mRNA** - RNA mensageiro

**NI7** - Região N-terminal do gene da Huntingtina que contém 17 aminoácidos

**PolyP** - Região rica em prolina

**RNA** - Ácido ribonucleico

**SAGA** - Complexo Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase

**SBMA** - Atrofia muscular bulboespinal

**SCAI** - Ataxias espinocerebelosa do tipo I

**SCA17** - Ataxias espinocerebelosa do tipo 17  
**SCA2** - Ataxias espinocerebelosa do tipo 2  
**SCA2-A** - Ataxia espinocerebelosa do tipo 2 caracterizada por Ataxia  
**SCA2-P** - Ataxias espinocerebelosa do tipo 2 caracterizada por Parkinsonismo  
**SCA3** - Ataxias espinocerebelosa do tipo 3  
**SCA6** - Ataxias espinocerebelosa do tipo 6  
**SCA7** - Ataxias espinocerebelosa do tipo 7  
**sgRNA** - RNA guia  
**shRNA** - *short hairpin* RNA  
**siRNA** - RNA de interferência pequeno  
**SMA** - Atrofia muscular espinal  
**SNALP** - Partículas lipídicas de ácido nucleico estáveis  
**SNC** - Sistema nervoso central  
**SNP** - Polimorfismo de nucleótido único  
**snRNPs** - Ribonucleoproteínas nucleares pequenas  
**SpCas9** - *Streptococcus pyogenes* Cas9  
**T** - Timina  
**TBP** - Proteína de ligação ao TATA  
**TFIID** - Fator de transcrição II D  
**UTR** - Região não traduzida

## Resumo

As doenças de poliglutaminas consistem num conjunto de nove doenças neurodegenerativas, causadas pela expansão anómala do trinucleótido CAG na região codificante do gene, que dá origem a uma proteína mutante com um segmento característico de poliglutaminas. A proteína mutante torna-se tóxica e, frequentemente, origina disfunção e morte neuronal progressiva que vai limitando progressivamente a vida dos doentes. As doenças de poliglutaminas incluem a Doença de Huntington, a Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana, a Atrofia Muscular Bulboespinal e as Ataxias Espinocerebelosas tipo 1, 2, 3, 6, 7 e 17.

Atualmente não existe tratamento eficaz para estas doenças, nem alternativas terapêuticas que possam limitar a sua progressão. No entanto, o carácter monogénico das doenças de poliglutaminas torna-as candidatas ideais para o desenvolvimento de terapias génicas. Para além, disso, a identificação de polimorfismos de nucleótido único que se encontram associados às repetições expandidas, em cada uma destas doenças, permite alcançar de forma seletiva o alelo mutante. Desta forma, recorrendo ao silenciamento genético do alelo mutante é possível manter o alelo normal e os níveis da proteína nativa necessários para um adequado desempenho celular.

Assim, os principais objetivos desta monografia foram, através de pesquisa bibliográfica e recorrendo a base de dados genéticas, identificar os polimorfismos de nucleótido único que se encontram associados às repetições expandidas, bem como as terapias de silenciamento alelo específicas já estudadas para cada uma das doenças de poliglutaminas.

**Palavras-chave:** Doenças de poliglutaminas, Expansão do trinucleótido CAG Polimorfismo de nucleótido único; Polimorfismo genético; Terapia génica; Silenciamento alelo específico.



## **Abstract**

Polyglutamine diseases are a group of nine neurodegenerative diseases caused by the abnormal expansion of the CAG trinucleotide in the coding region of the gene, which originates a mutant protein with a typical segment of polyglutamines. The mutant protein becomes toxic and it leads to progressive neuronal dysfunction and death that gradually limits patients' lives. Polyglutamine diseases include Huntington's Disease, Dentatorubral Pallidolusian Atrophy, Spinal and Bulbar Muscular Atrophy, and Spinocerebellar Ataxias type 1, 2, 3, 6, 7, and 17.

There is no effective treatment for these diseases or therapeutic alternatives that can limit their progression yet. However, the monogenic nature of polyglutamine diseases makes them ideal candidates for the development of gene therapies. Furthermore, the identification of single nucleotide polymorphisms that are associated with the expanded repeats in each of these diseases allows to selectively target the mutant allele. Therefore, it is possible to preserve the normal allele and the levels of the native protein for an adequate cell performance by genetic silencing of the mutant allele.

The main objectives of this monograph were to identify the single nucleotide polymorphisms that are associated with the expanded repeats, as well as the specific allele silencing therapies already studied for each polyglutamine diseases. This research was done by using bibliographical research and genetic databases.

**Keywords:** Polyglutamine disease; CAG expanded trinucleotide; Single nucleotide polymorphism; Genetic polymorphism; Gene therapy; Allele specific silencing.



## I. Doenças de poliglutaminas

As doenças de poliglutaminas consistem num conjunto de nove doenças neurodegenerativas caracterizadas pela expansão anómala do trinucleótido CAG na região codificante do gene, resultando na produção de uma proteína mutante que contém um segmento expandido de poliglutaminas. Esta alteração, quando é superior a um número mínimo de repetições, torna-se patogénica, levando à alteração da proteína em causa, e consequentemente, à sua função biológica. Estas incluem: a Doença de Huntington (HD), a Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana (DRPLA), as Ataxias Espinocerebelosas (SCA) do tipo 1, 2, 3, 6, 7 e 17, que têm uma herança autossómica dominante e, ainda, a Atrofia Muscular Bulboespinal (SBMA), que tem uma herança ligada ao cromossoma X, apresentando por isso maior prevalência no sexo masculino (**Tabela I**) (Zoghbi e Orr, 2000).

As doenças de poliglutaminas partilham várias características clínicas e patológicas. Geralmente surgem na meia-idade e levam à disfunção e perda neuronal progressiva entre 10 a 20 anos após o início dos sintomas, verificando-se a degeneração das funções motoras e cognitivas (Hughes e Olson, 2001; Zoghbi e Orr, 2000). Casos menos comuns ocorrem na infância, em que se verifica um número de repetições muito elevado. Apesar de se observar uma elevada distribuição da proteína mutante pelo cérebro e por outros tecidos, apenas uma população específica de neurónios é afetada em cada doença mostrando um padrão de degenerescência característico (Gatchel e Zoghbi, 2005; Zoghbi e Orr, 2000).

As repetições expandidas apresentam ainda instabilidade germinativa, uma vez que alteram o seu tamanho à medida que passam de uma geração para a seguinte, verificando-se fenótipos mais agressivos/severos para indivíduos com um número de repetições mais elevado, fenómeno ao qual se dá o nome de antecipação clínica (Zoghbi e Orr, 2000).

A expansão de poliglutaminas leva à desregulação celular a vários níveis que contribuem para a morte e disfunção neuronal (Williams e Paulson, 2008). Como revisto por Stoyas e Spada, vários mecanismos podem ser considerados a causa destas doenças, tais como: envelhecimento incorreto da proteína mutante, interações entre proteínas alteradas que perturbam o normal funcionamento de outras moléculas, formação de agregados tóxicos, desregulação da transcrição, comprometimento da autofagia, entre outros (Stoyas e Spada, 2018).

A agregação de proteínas é das características mais marcantes destas doenças e leva a alterações na solubilidade, criando agregados insolúveis que frequentemente dão origem a grandes inclusões intracelulares (DiFiglia *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Holmberg *et al.*, 1998; Igarashi *et al.*, 1998; Paulson *et al.*, 1997; Skinner *et al.*, 1997). Estas inclusões intracelulares

incluem outras proteínas que são recrutadas para manter a proteostase, tais como os componentes do sistema ubiquitina-proteossoma e as chaperonas moleculares, sugerindo, uma tentativa de manutenção de um normal funcionamento neuronal (Hughes e Olson, 2001; Lieberman, Shakkottai e Albin, 2019). Agregados proteicos também foram encontrados em cérebros de idosos saudáveis, sugerindo que a agregação possa ocorrer inicialmente, como uma resposta benigna, com o objetivo de proteger o organismo das expansões de poliglutaminas. A clivagem de proteínas expandidas por proteases é um fenômeno observado em todas as doenças de poliglutaminas, o que origina fragmentos truncados/clivados tóxicos, que geralmente estão contidos nos agregados proteicos (Revisto por Stoyas e Spada, 2018). Os agregados proteicos encontram-se no núcleo, no caso da SCA1, SCA6, SCA7 e SCA17, no citoplasma na SCA2 e, em ambos no caso de HD, DRPLA, SBMA e SCA3 (Gatchel e Zoghbi, 2005). Apesar de todos os dados já conhecidos destas doenças, ainda não está claro qual é o mecanismo molecular responsável pela sua patogenicidade e, conseqüentemente, não existe um tratamento eficaz que permita tratar estas doenças, nem terapias que limitem a sua progressão.

O principal objetivo desta monografia foi identificar e reunir todos os polimorfismos de nucleótido único que se encontram associados às repetições expandidas, bem como rever todas terapias de silenciamento alelo específicas já estudadas para cada uma das doenças de poliglutaminas, recorrendo a pesquisa bibliográfica e a base de dados genéticas.

## **1.1. Doença de Huntington**

A doença de Huntington (HD) é uma doença autossômica dominante causada pela repetição anormal do trinucleótido CAG no exão I do gene da huntingtina (*HTT*) que se encontra localizado no cromossoma 4p16.3 (Ambrose *et al.*, 1994; Youngman *et al.*, 1986). Das nove doenças de poliglutaminas, a HD é a mais comum, com uma prevalência global estimada de 13,7 casos a cada 100 000 indivíduos. Nas populações Caucasianas, que incluem Austrália, Europa, Reino Unido e América do Norte, a sua prevalência estimada está entre os 9,71 a 17,2 casos por 100 000 indivíduos (Fisher e Hayden, 2014; Rawlins *et al.*, 2016). Por outro lado, a prevalência da HD em países como Japão, China, Finlândia foi estimada entre os 0,4 e os 2 casos em cada 100 000 habitantes (Pringsheim *et al.*, 2012; Sipilä *et al.*, 2015; Xu e Wu, 2015).

Alelos normais do gene da *HTT* apresentam um número de repetições de CAG entre 9 a 35 (Kiesewetter *et al.*, 1993; Warby *et al.*, 2009). Repetições de CAG entre 27 e 35 são considerados alelos intermediários, nos quais existe probabilidade de expansão devido à instabilidade meiótica (Killoran *et al.*, 2013). Entre 36 e 39 repetições de CAG verifica-se

penetrância reduzida, na qual alguns indivíduos podem não desenvolver qualquer tipo de sintoma, enquanto outros podem desenvolver sintomas em idades mais avançadas. Para repetições de CAG iguais ou superiores a 40 ocorre penetrância completa (Rubinsztein *et al.*, 1996). A forma juvenil surge quando o número de repetições de CAG é superior a 55 e as manifestações clínicas surgem antes dos 20 anos de idade (Barbeau, 1970; Ghosh e Tabrizi, 2018).

A HD é caracterizada por uma combinação progressiva de sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos (Saudou e Humbert, 2016). As primeiras alterações motoras surgem, em média, aos 40 anos e os doentes morrem 15 a 20 anos após o diagnóstico. No entanto, estas alterações também podem ocorrer na infância, ou mais tarde, ao longo da vida (Ross e Tabrizi, 2011). Como descrito por Ross e colaboradores, os doentes de Huntington apresentam inicialmente uma fase pré-assintomática na qual não ocorrem manifestações da doença. Esta fase pode surgir até 10 a 15 anos antes do diagnóstico motor inicial. Posteriormente, evolui para uma fase prodrômica, onde ocorrem sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos ligeiros, que progridem de forma gradual até à morte (Ross *et al.*, 2014).

Existem dois tipos de sintomas motores, o primeiro é caracterizado por movimentos involuntários, rápidos e repetitivos, chamados movimentos coreicos, que tendem a aparecer nas primeiras manifestações da doença. O segundo inclui falta de coordenação, bradicinesia e rigidez, comprometendo desta forma os movimentos voluntários, que é mais notável quando a doença ocorre na infância, ou em doentes com início tardio em estágio avançado. À semelhança dos sintomas motores, os sintomas cognitivos progridem gradualmente ao longo do tempo, nos quais se verifica défice de atenção, diminuição da flexibilidade mental e lentidão cognitiva (Revisto em Bates *et al.*, 2015; Saudou e Humbert, 2016). Também podem surgir perturbações na fala. Estes sintomas podem levar a que doentes de Huntington se isolem socialmente. Sintomas psiquiátricos como: alterações de personalidade, desinibição social, impulsividade, irritabilidade, apatia são observáveis, sendo que a depressão e a ansiedade são os mais frequentes. Em casos mais raros, pode também ocorrer psicose semelhante à esquizofrenia (Bates *et al.*, 2015; Ghosh e Tabrizi, 2018; Ross *et al.*, 2014; Saudou e Humbert, 2016).

A HTT é uma proteína amplamente expressa em todos os tecidos e está particularmente enriquecida nos neurónios do sistema nervoso central (SNC) (Landwehrmeyer *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1993) Esta proteína tem um papel fulcral na manutenção das funções fisiológicas cerebrais e está envolvida em várias vias celulares importantes onde coordena e interage com outras proteínas através de múltiplos locais de interação (Zuccato,

Valenza e Cattaneo, 2010). Por possuir um sinal de localização nuclear e um sinal de exportação nuclear, pode ser encontrada no núcleo ou no citoplasma (Bessert *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2013). A expansão de CAG confere-lhe uma alteração conformacional, que se acredita que desencadeie uma “cascata patogénica”(Ross e Tabrizi, 2011). Esta alteração leva a um enrolamento incorreto da mesma, que culmina no rearranjo da sua estrutura na folha  $\beta$ -pregueada e na formação de inclusões neuronais no núcleo, mas também no citoplasma, dendrites e nos terminais dos axónios (Ross *et al.*, 2014; Ross e Tabrizi, 2011). A proteólise da HTT mutante em fragmentos também tem sido envolvida na contribuição da morte neuronal. Muitos outros mecanismos celulares são afetados na HD, tais como modificações pós-traducionais, desregulação da transcrição, disfunção do sistema ubiquitina proteossoma e da autofagia, entre outros (Revisto em Ghosh e Tabrizi, 2018).

O estriado é uma das zonas mais afetadas na HD, onde ocorre a degeneração de mais de 95% dos neurónios espinhosos médios que se projetam diretamente para o globo pálido e substância nigra (DiFiglia *et al.*, 1997; Ross e Tabrizi, 2011; Vonsattel *et al.*, 1985). Embora em menor quantidade, também ocorre degeneração do córtex cerebral, estruturas subcorticais, tálamo, entre outras regiões (Revisto em Ross e Tabrizi, 2011).

**Tabela 1 - Descrição das características genéticas, fenotípicas e manifestações clínicas das doenças de poliglutaminas. Adaptado de: Klockgether, Mariotti e Paulson, 2019; Lieberman, Shakkottai e Albin, 2019; Stoyas e Spada, 2018.**

Doença	Gene/locus	Proteína	Função nativa	N° CAG Normal	N° CAG Doença	Neuropatologia	Manifestações Clínicas	Notas adicionais
<b>HD</b>	HTT/ 4p16.3	Huntingtina	Proteína de interação	9-35	40-121	Estriado (neurónios espinhosos médios)	Coreia; disfunção cognitiva progressiva; alterações de personalidade; depressão	Penetrância reduzida entre 36 - 39 repetições de CAG
<b>SBMA</b>	AR/Xq11-12	Receptor de androgénio	Fator de transcrição hormono-dependente	6-36	37-70	Degeneração dos neurónios motores inferiores na espinal medula e tronco cerebral	Fraqueza muscular essencialmente dos membros inferiores; Atrofia do músculo esquelético	Alterações fenotípicas, devido a insensibilidade aos androgénios
<b>DRPLA</b>	ATN1/ 12p13.31	Atrofina-1	Correpressor transcripcional	3-35	53/54-88	Degeneração dos sistemas dentato-rubro e pálido-luisiano	Epilepsia; mioclonia; ataxia cerebelar; coreoatetose; demência	Heterogeneidade clínica.
<b>SCA1</b>	ATXN1/ 6p22.3	Ataxina-1	Regulador transcripcional	19-36	43-81	Cerebelo (células de Purkinje); tronco cerebral e espinal medula	Fenótipos atáxicos; atrofia muscular e bulbar progressiva; deficiência cognitiva	Interrupções de 1-3 CAT a cada segmento de CAG ≥21 repetições
<b>SCA2</b>	ATXN2/ 12q24.12	Ataxina-2	Metabolismo RNA	14-31	33-77	Cerebelo (células de – Purkinje); Atrofia do tronco cerebral, espinal medula, córtex cerebral e gânglios basais	Fenótipos atáxicos; diminuição da velocidade das sacadas; nistagismo; mioclonia e distonia.	Interrupções de 2 CAA a cada segmento de CAG de 22-23 repetições
<b>SCA3</b>	ATXN3/ 14q32.12	Ataxina-3	Desubiquitinase	10-51	55-87	Degeneração do cerebelo, córtex cerebral, espinal medula, tronco cerebral, gânglios basais entre outros	Ataxia; espasticidade; oftalmoplegia; sintomas piramidais e extrapiramidais; parkinsonismo	Heterogeneidade clínica
<b>SCA6</b>	CACNA1A /19p13	Subunidade α1A (Cav2.1) e α1ACT	Subunidade canais de cálcio e factor transcripcional	4-18	19-33	Disfunção cerebelar pura	Marcha atáxica, disfagia, disartria, nistagismo e descoordenação severa dos membros	RNA bicistrónico
<b>SCA7</b>	ATXN7/ 3p21-p12	Ataxina-7	Complexo SAGA	4-36	>36-→460	Cerebelo (células Purkinje), tronco cerebral e fotorreceptores da retina	Ataxia, perda visual, oftalmoplegia e sinais piramidais	
<b>SCA17</b>	TBP/ 6p27	Proteína de ligação ao TATA	Fator de transcrição	25-42	46-66	Cerebelo (células Purkinje), núcleo dentado, gânglios basais	Ataxia, espasticidade, transtornos psiquiátricos, demência, coreia	Repetições de CAG com interrupções de CAA

## 1.2. Atrofia Muscular Bulboespinal

A atrofia muscular bulboespinal (SBMA), também conhecida por doença de Kennedy, é caracterizada pela degeneração dos neurónios motores inferiores, responsáveis pela inervação do músculo esquelético, que leva à fraqueza muscular progressiva. Estima-se que a sua prevalência seja de 1 em cada 300 000 indivíduos e a sua presença foi relatada apenas em indivíduos de origem europeia e asiática (Spada, 2017; Tanaka *et al.*, 1996).

A SBMA ocorre quando o número de repetições de CAG no exão 1 do gene do recetor de androgénio (AR) (Xq11-12) é igual ou superior a 37 e tem uma herança ligada ao cromossoma X (Brown *et al.*, 1989; Lahunta e Glass, 2009; Ogata *et al.*, 1994; Spada *et al.*, 1991). Uma minoria das mulheres portadoras ( $\geq 37$  repetições de CAG) apresentam sintomas leves como tremor ou cólicas, uma vez que possuem baixa estimulação destes recetores (Mariotti *et al.*, 2000). Quando as mães testadas são heterozigóticas, a probabilidade de transmitirem o gene mutante à descendência é de 50%. Por outro lado, os homens quando apresentam um segmento de poliglutaminas com um número de CAG superior ou igual a 37 manifestam os sintomas da doença e, caso sejam férteis, nunca transmitem a expansão de CAGs aos seus filhos e as suas filhas serão sempre portadoras (Revisto em Spada, 2017).

O diagnóstico inicial é feito com base nos sinais e sintomas motores e, quando associado a história familiar deve ser confirmado com testes genéticos moleculares. Estes pacientes são frequentemente mal diagnosticados, confundidos com outras doenças neuromusculares, como esclerose lateral amiotrófica e atrofia muscular espinal (SMA) (Cortes e Spada, 2018; Parboosingh *et al.*, 1997).

Na SMBA, os neurónios motores inferiores do tronco cerebral e da espinal medula são afetados pela expansão de poliglutaminas, assim como os músculos bulbares e esqueléticos proximais (Poletti, 2004; Sorarù *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas iniciais surgem entre os 30 e os 50 anos de idade, podem ser precedidas por tremor, câibras, fraqueza muscular proximal, fasciculações e níveis elevados da proteína creatina quinase sérica (Amato *et al.*, 1993; Chahin e Sorenson, 2009; Harding *et al.*, 1982). À medida que a doença progride, observa-se fraqueza muscular, principalmente dos membros inferiores, diminuição ou ausência de reflexos tendinosos, atrofia do músculo esquelético, fasciculações da língua e lábios, e diminuição da fertilidade. Ainda na adolescência pode surgir atrofia testicular e ginecomastia, provocada pela insensibilidade aos androgénios (Arbizu *et al.*, 1983; Harding *et al.*, 1982). Nas fases terminais da doença, também pode ocorrer disfagia (Warnecke *et al.*, 2009). Como revisto por Breza e Koutsis, outras manifestações

clínicas, tais como apneia obstrutiva do sono e distúrbios metabólicos estão associadas a esta doença (Breza e Koutsis, 2019).

Das várias doenças de poliglutaminas, a SBMA é a única em que se sabe a função nativa da proteína em causa. Os androgénios são hormonas importantes para o desenvolvimento normal do sexo masculino e dos seus caracteres sexuais secundários (MacLean *et al.*, 1993). Os ARs, amplamente expressos em vários tecidos do corpo, pertencem à superfamília de recetores esteróides e nucleares, que atuam como fatores de transcrição dependentes de ligação por estas hormonas (Gelman, 2002; MacLean *et al.*, 1993). Atualmente, acredita-se que a patogenicidade da proteína mutante devida à expansão de poliglutaminas origina um ganho de função tóxico, e simultaneamente, uma perda de função do AR que também contribui para o fenótipo da doença (Revisto por Grunseich, Rinaldi e Fischbeck, 2014).

A proteína mutada leva à formação de agregados proteicos nos neurónios motores, músculo-esquelético, entre outros tecidos, que posteriormente dão origem a inclusões intranucleares (Adachi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1998). Estas alterações levam à desregulação transcripcional, disfunção autofágica e disfunção da proteostase, uma vez que estas inclusões se apresentam fortemente ubiquitinadas o que sugere falha no sistema de degradação pelo sistema ubiquitina proteossoma (Li *et al.*, 1998; Mhatre *et al.*, 1993; Nedelsky *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2007). Atualmente, sabe-se que estas alterações são responsáveis pela disfunção dos neurónios motores inferiores e perda neuronal; no entanto, o mecanismo exato que leva ao comprometimento neuronal ainda é desconhecido (Revisto em Breza e Koutsis, 2019).

### **1.3. Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana**

A Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana (DRPLA) é uma doença neurodegenerativa, autossómica dominante e surge quando o número de repetições de CAG no exão 5 do gene da atrofina I (*ATN1*), que se localiza no braço pequeno do cromossoma 12 (12p13.31), é superior a 53 ou 54 (Ber *et al.*, 2003; Ikeuchi *et al.*, 1995; Kanazawa, 1998; Koide *et al.*, 1994; Komure *et al.*, 1995; Nagafuchi *et al.*, 1994; Oyanagi, 2002; Yamada, 2010). Apesar da DRPLA afetar toda a população mundial, surge com maior frequência na população japonesa, onde tem uma prevalência de 0,48 casos em cada 100 000 habitantes (Tsuji *et al.*, 2008). A DRPLA é caracterizada pela degeneração severa dos sistemas dentato-rubro e pálido-luisiano do SNC (Kanazawa, 1998; Tsuji, 2012). A doença está associada à perda neuronal severa no córtex cerebral e cerebelar e tronco cerebral, sendo as zonas mais afetadas os núcleos dentado e rubro, o globo pálido, núcleo subtalâmico e o estriado (Tsuji, 2012; Zoghbi e Orr, 2000). O núcleo dentado é geralmente o mais afetado, com maior perda neuronal, contudo também

ocorre perda neuronal significativa no globo pálido, mais pronunciada nos segmentos externos do que nos segmentos internos (Kanazawa, 1998; Yamada, 2010).

A função desempenhada pela ATNI ainda é desconhecida. No entanto, um estudo realizado com o gene *ATNI* de *Drosophila* sugere que funciona como correpressor transcripcional (Zhang *et al.*, 2002). A ATNI mutante forma agregados insolúveis através da sua acumulação nos núcleos dos neurónios, adquirindo uma função tóxica. A estes agregados insolúveis dá-se o nome de inclusões intranucleares neuronais que contêm a proteína mutante e têm sido amplamente detetadas em doentes com DRPLA, nomeadamente em neurónios e células da glia positivas para a ubiquitina (Oyanagi, 2002; Takahashi *et al.*, 2001; Terashima *et al.*, 2002; Tsuji, 2012; Yamada, 2010). A alteração de diversos mecanismos celulares, revistos por Stoyas e Spada, parecem estar associados à desregulação transcripcional, que pode desempenhar um papel relevante na patogénese da DRPLA (Stoyas e Spada, 2018).

À semelhança da HD, SBMA e SCA3, a proteína mutante está tanto no núcleo, como no citoplasma dos neurónios, uma vez que apresenta um sinal de localização nuclear e um sinal de exportação nuclear (Ber *et al.*, 2003; Suzuki e Yazawa, 2011). Estudos demonstraram que mutações no sinal de exportação nuclear desta proteína, altera a sua localização nativa o que origina uma acumulação no núcleo e aumento da toxicidade celular (Nucifora *et al.*, 2003; Suzuki e Yazawa, 2011).

A DRPLA pode manifestar-se desde o início da vida até à idade adulta, surgindo em média aos 47 anos de idade. As características clínicas são heterogéneas e dependem do início dos sintomas, podendo ser distinguida em três tipos. Caso o início dos sintomas ocorra antes dos 20 anos de idade, designa-se de “início juvenil” e as manifestações clínicas geralmente consistem em ataxia progressiva, epilepsia, mioclonia, e declínio intelectual (Revisto em Oyanagi, 2002; Tsuji, 2012; Yamada, 2010). As convulsões são a característica mais frequente no início juvenil, que vai diminuindo para idades superiores a 20 anos. Quando a doença se inicia em adultos com idades entre 20 e 40 anos, chamado de “início adulto precoce”, apresenta frequentemente ataxia cerebelar e coreoatetose. Pacientes mais velhos, com idades superiores a 40 anos, chamado de “início adulto tardio”, desenvolvem maioritariamente demência, ataxia cerebelar e coreoatetose (Kanazawa, 1998, 1999; Yamada, 2010). No entanto, quase todos os doentes com início em adulto apresentam alterações de personalidade, que são muito importantes para a realização do diagnóstico (Kanazawa, 1998). Ainda assim, as manifestações clínicas observadas na DRPLA são muito semelhantes às observadas noutras doenças de poliglutaminas e frequentemente ocorrem erros de diagnóstico clínico; deste modo, devem ser sempre realizados testes genéticos para validação do diagnóstico (Tsuji, 2012). A heterogeneidade das manifestações clínicas observadas

conforme a idade de início dos sintomas está relacionada maioritariamente com o número de repetições de CAG e a antecipação genética (Tsuji, 2012).

#### **1.4. Ataxia Espinocerebelosa Tipo I**

A ataxia espinocerebelosa do tipo I (SCA1) é uma doença neurodegenerativa progressiva, autossômica dominante, caracterizada por uma expansão anormal de poliglutaminas no exão 8 do gene *ATXN1* que está localizado no cromossoma 6 (6p22.3) e que dá origem à proteína ataxina-1 (*ATXN1*) (Banfi *et al.*, 1993; Orr *et al.*, 1993). A prevalência da SCA 1 é de aproximadamente 2 em cada 100 000 habitantes. À semelhanças de outras doenças de poliglutaminas, a prevalência poderá ser variável consoante a região no globo. Por exemplo, Krysa *et al.* avaliou a prevalência de SCA1 na Polónia em 68%, ao estudar um conjunto de ataxias cerebelares autossômicas dominantes, que incluíram: SCA1, SCA2, SCA3, SCA8 e SCA17 (Krysa *et al.*, 2016). Em 2016, Platonov e colaboradores identificaram a SCA1 como a principal e provavelmente o único tipo de ataxia cerebelar autossômica dominante em Sakha, uma região no leste da Sibéria (Opal e Ashizawa, 1993; Platonov *et al.*, 2016). Indivíduos normais, apresentam uma expansão de 19 a 36 CAGs e contêm uma interrupção de 1 a 3 CATs (tripleto que codifica para a histidina) a cada 21 repetições de CAG, o que possivelmente confere uma maior estabilidade no segmento de poliglutaminas evitando a alteração da sua conformação (Chung *et al.*, 1993; Orr *et al.*, 1993). Indivíduos com expansões entre 36 a 38 repetições de CAG podem resultar em ataxia sem manifestações clínicas características da SCA1 (Zühlke *et al.*, 2002). Caso o número de repetições de CAG esteja entre 43-81 a SCA1 torna-se altamente penetrante (Chung *et al.*, 1993). O início dos sintomas que permitem o diagnóstico surge por volta dos 30-40 anos de idade e culmina na morte após 10 a 30 anos (Revisto em Ortiz e Orr, 2018; Tejwani e Lim, 2020). No entanto, tal como nas outras doenças de poliglutaminas, consoante o número de repetições de CAGs, a doença pode surgir mais cedo ou mais tarde ao longo da vida e apresentar manifestações clínicas mais ou menos severas, respetivamente (Ranum *et al.*, 1994). Para a realização do diagnóstico, o teste genético é considerado o método mais rápido e preciso.

As manifestações clínicas mais frequentes são ataxia cerebelar e fraqueza muscular progressiva, que leva a dificuldades na fala, deglutição e controlo da respiração (Zoghbi e Orr, 1995). Nos estados mais tardios da doença verifica-se, ainda, deficiência cognitiva e atrofia muscular e bulbar. Infecções pulmonares crónicas e insuficiência respiratória são as principais causas de morte (Revisto por Ortiz e Orr, 2018). A nível celular verifica-se uma disfunção e degeneração profunda das células de Purkinje do cerebelo, o que mostra maior vulnerabilidade destas células à *ATXN1* mutante. Como consequência observam-se fenótipos atáxicos, uma

vez que as células de Purkinje são responsáveis pelo planeamento, execução e coordenação motora (Womack *et al.*, 2006; Zoghbi e Orr, 1995). Além da atrofia e degeneração do cerebelo, também ocorre atrofia do tronco cerebral e espinal medula (Zoghbi e Orr, 1995).

A função desempenhada pela ATXN1 ainda não é totalmente conhecida, porém sabe-se que interage com outras proteínas que se encontram na célula, modulando a transcrição e o processamento do RNA-mensageiro (mRNA) (Revisto por Ortiz e Orr, 2018). Os fenómenos moleculares originados pela patogenicidade da proteína mutante também não estão totalmente compreendidos. No entanto, sabe-se hoje que as alterações são devidas a um ganho de função tóxico da ATXN1 mutante e não devido à perda de função da proteína nativa. Por exemplo, estudos realizados em murganhos mostraram que a perda de função da ataxina-1 não induz as manifestações clínicas observadas, tais como neurodegeneração e fenótipos atáxicos (Matilla *et al.*, 1998). Klement *et al.* mostrou ainda, em murganhos, que, quando o sinal de localização nuclear da ATXN1 mutante (82 repetições de CAG) estava inativo (mutado) não ocorria desenvolvimento da doença. Deste modo, foi possível verificar que a ATXN1 mutante induz neurotoxicidade após translocação para o núcleo em murganhos (Klement *et al.*, 1998). A expansão de poliglutaminas favorece assim a manutenção da ATXN1 mutante no núcleo, que contribui para a formação de corpos de inclusão, causando neurotoxicidade, à semelhança das outras doenças de poliglutaminas.

## **1.5. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2**

A ataxia espinocerebelosa do tipo 2 (SCA2) foi descrita pela primeira vez na Índia e é a segunda ataxia espinocerebelosa autossómica dominante mais frequente em todo o mundo, a seguir à SCA3. A SCA2 tem uma prevalência estimada de 1 a 5 em cada 100 000 indivíduos, que varia conforme a localização geográfica. A maior prevalência ocorre em Cuba, Índia, México e no sul de Itália (Revisto em Egorova e Bezprozvanny, 2019). A SCA2 surge quando o número de repetições de CAGs é superior ou igual a 33 na zona codificante do exão 1 do gene *ATXN2*, localizado no braço longo do cromossoma 12 (12q24.12) e que dá origem à proteína ataxina-2 (*ATXN2*) mutante. Indivíduos normais apresentam uma expansão de poliglutaminas entre 14-31 repetições; no entanto, à semelhança da SCA1, ocorrem frequentemente interrupções de dois trinucleótidos CAA a cada 22-23 repetições de CAG no gene da *ATXN2* (Fernandez *et al.*, 2000; Imbert *et al.*, 1996; Pulst *et al.*, 1996). Expansões de CAGs intermédias entre 27-33 repetições foram descritas como um fator de risco para desenvolver esclerose lateral amiotrófica associada a *ATXN2*, que afeta não só os neurónios superiores e inferiores, mas também leva à degeneração das células de Purkinje ao contrário da esclerose lateral amiotrófica comum (Elden *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2016). A idade de início

dos sintomas varia com o número de repetições de CAG, no entanto ocorre frequentemente entre os 20-30 anos de vida (Revisto por Velázquez-pérez, Rodríguez-Labrada e Fernandez-Ruiz, 2017).

A degeneração severa das células de Purkinje gera fenótipos atáxicos característicos e sintomas como a dificuldade na fala, nistagismo (movimentos oculares involuntários rítmicos) e dismetria ocular (erro de medição após atos musculares) são frequentes (Revisto em Egorova e Bezprozvanny, 2019). A diminuição da velocidade das sacadas oculares é outra característica predominante nesta doença, revelando-se uma ferramenta importante para o diagnóstico e prognóstico da doença, uma vez que quanto maior a expansão de CAGs, maior é a diminuição da velocidade das sacadas oculares (Achsel, Stark e Lührmann, 2001; Velázquez-Pérez *et al.*, 2004). A progressão é frequente, levando à paralisia dos olhos nas direções horizontal e vertical e é resultado da degeneração progressiva dos neurónios do tronco cerebral oculomotor (Bürk *et al.*, 1999; Klostermann *et al.*, 1997). Outros sintomas que podem ocorrer são espasmos rápidos e involuntários (mioclonia) e contrações musculares involuntárias de longa duração (dystonia) (Geschwind *et al.*, 1997). No entanto, pacientes de origens diferentes podem apresentar sintomas distintos, dentro dos descritos acima (Auburger, 2012).

A ATXN2 mutante adquire funções tóxicas, que resultam na morte de uma vasta população neuronal no cerebelo, córtex cerebral, espinal medula, tronco cerebral, gânglios basais, entre outras estruturas (Estrada *et al.*, 1999; Rüb *et al.*, 2007; Seidel *et al.*, 2012). A degeneração dos lobos frontotemporais e da substância nigra pode ocorrer levando a sintomas da doença de Parkinson (Zoghbi e Orr, 2000).

A ATXN2 é uma proteína citoplasmática abundantemente expressa em diversos tecidos e neurónios do corpo (Revisto por Jensen, Beylertgil e Shaikh, 2019). Atualmente, sabe-se que a ATXN2 está envolvida no processamento e metabolismo do RNA. No entanto, dado que interage com várias proteínas, é provável que esteja envolvida em muitas outras funções (He e Parker, 2000; Neuwald e Koonin, 1998; Satterfield e Pallanck, 2006). Após tradução, a proteína mutante forma corpos de inclusão predominantemente no citoplasma adquirindo um ganho de função tóxico (Huynh *et al.*, 2003). Os mecanismos moleculares que parecem estar envolvidos na SCA2 são agregação, desregulação da homeostase do cálcio, stress oxidativo, disfunção da sinalização celular e da autofagia (Revisto por Egorova e Bezprozvanny, 2019). Atualmente, não há cura para a SCA2, nem terapias que atrasem a sua progressão, apenas tratamento sintomático e cuidados paliativos.

## **I.6. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3**

A ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), também conhecida por doença de Machado-Joseph (MJD) é atualmente considerada a ataxia espinocerebelosa autossômica dominante mais frequente em todo o mundo, com uma prevalência estimada de 3 casos por 100 000 indivíduos, apresentando elevada variabilidade entre regiões (Revisto em Sullivan *et al.*, 2019). Por exemplo, em 2018, Martins e Sequeiros relataram a distribuição da SCA3 a nível mundial, sendo mais frequente na China (62,1%), Brasil (59,6%), Portugal (57,8%), Tailândia (46,5%), Alemanha (42%), Singapura (41%), Taiwan (32%), França (32%), Japão (28%), Holanda (28%), Venezuela (25%), EUA (21%) e Espanha (15%). Por outro lado, à data, a SCA3 parecia estar ausente na Grécia, República Checa, Chipre, Sri Lanka, Polónia, Finlândia e Sérvia; e considerada rara na Turquia (0,6%) e na África do Sul (1,1%) (Martins e Sequeiros, 2018).

A SCA3 é causada por uma expansão instável do trinucleótido CAG no exão 10 do gene da ataxina-3 (*ATXN3*), localizado no cromossoma 14 (14q32.12) (Ichikawa *et al.*, 2001; Kawaguchi *et al.*, 1994). Indivíduos normais apresentam uma variação de 10 a 51 repetições de CAG, enquanto indivíduos doentes apresentam uma variação de 55 a 87 repetições de CAG (Revisto por Nóbrega *et al.*, 2018). Normalmente, o início dos sintomas surge entre os 20 e os 50 anos de idade e progridem ao longo do tempo (Coutinho e Andrade, 1978).

Os sintomas mais comuns são ataxia cerebelar progressiva, que dá origem a descoordenação motora e pode afetar o equilíbrio, a marcha, a fala e o movimento ocular. No entanto, a SCA3 também é caracterizada pela ocorrência de espasticidade, distonia, rigidez, disartria e disfagia. Outros sintomas como perda sensorial, perturbações do sono, fadiga, disfunção olfatória, dor crónica, perda de peso, défice cognitivo e afetivo, alterações psiquiátricas, défice de atenção e execução, ansiedade e comportamentos depressivos podem ser observados (Revisto em Costa e Paulson, 2012; Matos, Almeida e Nóbrega, 2019; Mcloughlin, Moore e Paulson, 2019; Mendonça *et al.*, 2018). As características clínicas apresentam grande variabilidade, o que levou à classificação da SCA3 em 5 tipos. Tal como revisto por Costa e Paulson, o início dos sintomas da SCA3 do tipo I ocorre precocemente e surge em indivíduos com uma média de idades de 24 anos. A progressão dos sintomas é rápida e é caracterizada por fenótipos atáxicos, oftalmoplegia, sintomas piramidais, como espasticidade e rigidez, e extrapiramidais, como distonia. O tipo II é o mais frequente e ocorre em doentes com início dos sintomas numa idade intermédia, aproximadamente 40 anos e é caracterizado por ataxia cerebelar, com ou sem sintomas extrapiramidais, e oftalmoplegia. O tipo III é o segundo tipo mais prevalente e é caracterizado pelo início tardio, surge por volta dos 46 anos e apresenta ataxia cerebelar, oftalmoplegia e alterações no sistema nervoso

periférico, como neuropatia motora e atrofia muscular. O tipo IV é raro e ocorre em pacientes com um reduzido número de repetições de CAG. Caracteriza-se principalmente pela ocorrência de parkinsonismo lentamente progressivo. Por fim, o tipo V é caracterizado por paraplegia espástica pura com ou sem ataxia cerebelar (Costa e Paulson, 2012). De um modo geral, as consequências originam alterações nas várias regiões do cérebro, em particular no tronco cerebral e levam à morte 10-15 anos após o início dos sintomas (Revisto em Diallo *et al.*, 2018).

A SCA3 resulta na disfunção e perda neuronal de uma vasta gama de estruturas cerebrais, tais como o tronco cerebral, cerebelo, tálamo, gânglios de base e espinal medula. A SCA3 também leva à degeneração dos neurónios no núcleo rubro, núcleo subtalâmico, globo pálido, substância nigra e dos núcleos dos nervos cranianos. No cerebelo, foi reportada a degeneração das células de Purkinje no vérmis cerebelar. Por outro lado, no córtex estas células parecem ser preservadas. Os núcleos da coluna de Clarke e o corno anterior da espinal medula também apresentam alterações (Dürr *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 2002; Rüb *et al.*, 2003).

Na SCA3, à semelhança das outras doenças de poliglutaminas, ocorre acumulação de corpos de inclusão insolúveis que contêm expansões de poliglutaminas nas zonas cerebrais afetadas. Contudo, outros estudos mostraram que estes agregados também podem ser encontrados em zonas não afetadas, não existindo uma relação evidente entre a degeneração das zonas afetadas e a distribuição destes agregados (Paulson *et al.*, 1997; Rüb *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 1998).

A maior parte dos agregados encontram-se sob a forma de inclusões nucleares neuronais, ainda que também ocorram inclusões citoplasmáticas neuronais e agregados em axónios conhecidos por degenerarem na SCA3 (Revisto em Costa e Paulson, 2012; Mcloughlin, Moore e Paulson, 2019). As inclusões nucleares neuronais são positivas para a ubiquitina e contêm outras proteínas, tais como proteínas de choque térmico, subunidades do proteossoma, fatores de transcrição e outras proteínas com expansões de poliglutaminas (Hayashi, Kobayashi e Furuta, 2003; Seidel *et al.*, 2016, 2010). Por outro lado, as inclusões citoplasmáticas neuronais apresentam segmentos poliglutamínicos expandidos, sobretudo negativos para a ubiquitina, e os agregados axonais são positivos para a ubiquitina (Costa e Paulson, 2012).

A ATXN3 é uma proteína de localização principal citoplasmática e desempenha funções ligadas à proteólise mediada por ubiquitina, sendo considerada uma desubiquitinase. Atualmente, ainda não está totalmente compreendido o papel desempenhado pela ATXN3 mutante na neurodegeneração e se a sua patogénese é devida a um ganho de função ou perda de função (Burnett, Li e Pittman, 2003; Chai *et al.*, 2004; Donaldson *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*,

1998; Takahashi, Katada e Onodera, 2010). No entanto, vários estudos ao longo dos últimos anos identificaram mecanismos moleculares disfuncionais associados à ATXN3 mutante, tais como: autofagia, modificações pós-tradução, sistema ubiquitina-proteossoma, regulação transcricional, entre outros (Revisto por Nóbrega *et al.*, 2018).

Atualmente não existe uma terapêutica curativa para combater a doença e apenas são utilizadas terapêuticas sintomáticas, assim como fisioterapia.

## **I.7. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 6**

A ataxia espinocerebelosa do tipo 6 (SCA6) é uma doença neurodegenerativa, autossômica dominante e estima-se que a sua prevalência seja de 0,02 a 0,31 casos em cada 100 000 indivíduos e atualmente não existe tratamento para esta doença neurodegenerativa (Revisto em Casey e Gomez, 2019). A SCA6 é caracterizada por uma expansão anormal do trinucleótido CAG no exão 47 do gene *CACNA1A* localizado no cromossoma 19p13.1-p13.2 (Catterall, 2004; Zhuchenko *et al.*, 1997). Este gene codifica a subunidade  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) que forma o poro dos canais de cálcio neuronais dependentes de voltagem do tipo P/Q. A subunidade  $\alpha 1A$  tem uma distribuição ubíqua, verificando-se uma maior expressão nas células de Purkinje e granulares do córtex cerebelar (Hillman *et al.*, 1991; Ishikawa *et al.*, 1997; Pietrobon, 2002; Westenbroek *et al.*, 1995; Zhuchenko *et al.*, 1997).

Indivíduos normais apresentam entre 4-18 repetições de CAG no C-terminal da subunidade  $\alpha 1A$ , enquanto indivíduos com a doença apresentam entre 19-33 repetições (Revisto em Du e Gomez, 2018). O início dos sintomas surge em média aos 50 anos (Stevanin *et al.*, 1997). Tal como nas outras doenças de poliglutaminas, e, de acordo com o comprimento do segmento de CAG, pode surgir desde o início da vida até à idade adulta. Os sintomas iniciais incluem frequentemente desequilíbrio e instabilidade na marcha. Gradualmente ocorre a progressão da doença e os pacientes apresentam marcha atáxica, disfagia, disartria, nistagismo e descoordenação severa dos membros (Gomez *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 1997; Zhuchenko *et al.*, 1997). A ocorrência de disfunção cognitiva não tinha sido ainda relatada, no entanto, este tema tem gerado alguma discussão (Globas *et al.*, 2003)(Suenaga *et al.*, 2008). A atrofia cerebelar é muito evidente, sendo considerada como disfunção cerebelar pura, na qual ocorre degeneração das células de Purkinje, essencialmente no vérmis cerebelar (Yang *et al.*, 2000; Zhuchenko *et al.*, 1997). Ao contrário das outras SCAs, nas quais se verifica disfunção e degeneração de outras zonas cerebrais, na SCA6 apenas se observa degeneração restrita e limitada dos neurónios presentes no núcleo olivar inferior (Geschwind *et al.*, 2016; Gomez *et al.*, 1997).

A mutação no gene *CACNA1A* não é exclusiva da SCA6, existindo duas outras doenças semelhantes com herança autossômica dominante em que os mecanismos de doença estão relacionados com alterações nos canais de cálcio: a ataxia episódica do tipo 2 e a enxaqueca hemiplégica familiar (Griggs e Nutt, 1995; Ophoff *et al.*, 1996). O diagnóstico deve, por isso, ser confirmado por testes genéticos.

Recentemente, estudos sugeriam duas teorias distintas para a patogênese da SCA6. Inicialmente, estudos apontavam que a patogênese da SCA6 era derivada de uma canalopatia iônica, uma vez que a expansão de poliglutaminas perturba a função dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo P/Q, que regulam processos intracelulares tais como a secreção, contração, neurotransmissão e expressão gênica (Matsuyama *et al.*, 1999; Toru *et al.*, 2000). A outra teoria, e que atualmente é a mais aceita, sugere que a expansão do trato de poliglutaminas é responsável pela patogênese da SCA6, partilhando os mecanismos patogênicos das outras doenças de poliglutaminas. O modelo patogênico da SCA6 compreende que a expansão de poliglutaminas no C-terminal da subunidade  $\alpha 1A$  é clivada e, após translocação para o núcleo, torna-se tóxica, originando a SCA6 (Kordasiewicz *et al.*, 2006).

O gene *CACNA1A* codifica um mRNA bicistrônico que dá origem a duas proteínas: a subunidade  $\alpha 1A$  e ao fator de transcrição  $\alpha 1ACT$ . O fator de transcrição  $\alpha 1ACT$  regula a expressão de genes importantes no desenvolvimento das células de Purkinje e diferenciação neuronal (Du *et al.*, 2013; Du, Semler e Gomez, 2014). A desregulação da transcrição causada pela expansão do segmento poliglutamínico no fator de transcrição  $\alpha 1ACT$  altera a sua função transcripcional, causa morte celular em cultura, origina atrofia cerebelar e fenótipos semelhantes aos observados na SCA6 em murganhos transgênicos (Du *et al.*, 2013). Por fim, estes resultados indicam que a expansão de poliglutaminas, ao prejudicar a viabilidade do fator de transcrição  $\alpha 1ACT$ , bem como a subunidade  $\alpha 1A$  origina SCA6. Deste modo, será necessário um melhor entendimento sobre o gene, as suas proteínas e os mecanismos moleculares subjacentes, para que possa ser possível desenvolver terapias para a SCA6.

## **1.8. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 7**

A ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) é uma doença neurodegenerativa, autossômica dominante e é considerada a ataxia menos comum, com uma prevalência global estimada inferior a 1 pessoa em cada 300 000 indivíduos e surge com maior frequência no norte de África e na Europa (García-Velázquez *et al.*, 2014; Spada, 2020).

A SCA7 é causada pela expansão anormal do trinucleótido CAG no gene *ATXN7* que está localizado no cromossoma 3p12-21.1 (Holmberg *et al.*, 1995). Este gene codifica a ataxina-7 (*ATXN7*), que tem uma distribuição ubíqua e é um dos componentes do complexo Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase (SAGA), um complexo altamente conservado e que está envolvido na regulação da transcrição (Helmlinger *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2002; Scheel *et al.*, 2003). O complexo SAGA contém dois módulos enzimáticos e regula a transcrição através da modificação das histonas: a acetilação realizada pela histona acetil-transferase (HAT), que permite a descompactação da cromatina e a ligação dos fatores de transcrição, e a desubiquitinação (DUB) que é essencial para a manter a ativação da transcrição (Revisto por Koutelou, Hirsch e Dent, 2011). A *ATXN7* faz parte do módulo DUB em conjunto com outras moléculas. O gene *ATXN7* contém três sinais localização nuclear e um sinal de exportação nuclear, e dá origem a duas isoformas da proteína: a *ATXN7a* que se encontra essencialmente no núcleo e a *ATXN7b* no citoplasma. Calcula-se que a localização destas duas isoformas se deve a uma extensão no C-terminal existente na *ATXN7b* (Einum *et al.*, 2003; Helmlinger *et al.*, 2004). Atualmente, ainda não é claro qual das duas isoformas é responsável pela patogenicidade da SCA7, bem como qual a função da *ATXN7* no citoplasma.

Indivíduos que apresentam um número de repetições de CAG entre 4-36 não manifestam a doença. Quando o número de repetições de CAG é superior a 36 surgem manifestações clínicas da doença, podendo alcançar valores superiores a 460 repetições. A SCA7 é, por isso, a doença de poliglutaminas que apresenta maior tendência para expansão do segmento poliglutaminico entre gerações. No entanto, o mais frequente é observar repetições de CAG que variam entre 36-55. Alelos com repetições superiores a 70 CAGs dão origem a um início juvenil, em que a doença se torna mais severa e com desenvolvimento mais acelerado. As manifestações clínicas que caracterizam a SCA7 são a ataxia cerebelar e a degeneração macular que leva à cegueira. Para elevados números de repetições de CAG, frequentemente surge disfunção da visão que evolui para a cegueira e posteriormente ataxia cerebelar, enquanto para menores números de repetições, se verifica o oposto (David *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998; Michalik, Martin e Broeckhoven, 2004; Warrenburg *et al.*, 2001).

O início dos sintomas surge com mais frequência entre os 20 e os 40 anos de idade (Revisto em Martin, 2012). Outras manifestações clínicas frequentes são, disfagia, disartria, diminuição da velocidade das sacadas oculares, oftalmoplegia e sinais piramidais, que são causados pela degeneração e morte neuronal das células de Purkinje, núcleo olivar inferior, base da ponte e neurónios presentes na camada granular do cerebelo, ainda que em menor extensão. A perda neuronal noutras estruturas cerebrais, são frequentemente relatadas em indivíduos que manifestam início tardio da doença. A característica que permite distinguir a

SCA7 de outras doenças de poliglutaminas é a disfunção dos fotorreceptores do cone, comprometendo a visão das cores que progride para a degeneração do cone-bastonete culminando em cegueira (Giunti *et al.*, 1999; Michalik, Martin e Broeckhoven, 2004; Rüb *et al.*, 2005, 2008). A acumulação de agregados de ATXN7 mutante no núcleo dos neurónios surge em tecidos afetados e não afetados. A toxicidade gerada por estes agregados ainda não é clara; no entanto, acredita-se que o enrolamento anormal da proteína mutante origina as espécies mais tóxicas. A proteólise também é responsável pela acumulação e toxicidade de fragmentos proteicos. A ATXN7 mutante é clivada pela caspase-7, que dá origem a fragmentos contendo as expansões de poliglutaminas que aparentam ser mais tóxicas que a ATXN7 mutante de comprimento total (Garden *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2007).

Apesar da forte investigação em torno da SCA7 tenha permitido um maior entendimento sobre a doença, os mecanismos da doença ainda não são conhecidos para que seja possível o desenvolvimento de uma terapia eficaz para o seu tratamento.

## **1.9. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 17**

A ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17) é uma doença hereditária, autossómica dominante e estima-se que a sua prevalência seja de 0,47 em cada 1 000 000 e foram reportadas menos de 100 famílias com SCA17 em todo o mundo (Maruyama *et al.*, 2002; Toyoshima *et al.*, 2019). A SCA17 é caracterizada por uma expansão de poliglutaminas no gene da proteína de ligação ao TATA (TBP), uma subunidade do fator de transcrição II D (TFIID) que compõe o complexo de pré-iniciação da transcrição em células eucarióticas. A TBP é um fator de transcrição amplamente expresso que desempenha um papel fundamental na transcrição génica e que se localiza no exão 3 do cromossoma 6q27 (Dantonel *et al.*, 1999; Koide *et al.*, 1999; Martianov, Viville e Davidson, 2002; Nakamura *et al.*, 2001). Na SCA17, os segmentos expandidos são caracterizados por repetições de CAG, na qual ocorrem interrupções de CAA, que aparentam conferir estabilidade ao segmento poliglutamínico aquando da transmissão entre gerações, o que dá origem a uma antecipação muito reduzida. A SCA17 apresenta elevada variabilidade fenotípica que inclui ataxia, demência, transtornos psiquiátricos e coreia (Dorsman *et al.*, 2002; Koutsis *et al.*, 2014). Uma vez que algumas das suas manifestações clínicas se assemelham à doença de Huntington, esta foi chamada de Doença de Huntington Tipo-4 (Stevanin e Brice, 2008).

Alelos normais incluem 25 a 42 repetições de CAG/CAA. A maioria dos alelos mutantes na SCA17 variam entre 46 a 55 CAG/CAA e as manifestações clínicas frequentes são ataxia cerebelar, sinais piramidais como espasticidade e rigidez, movimentos involuntários que incluem coreia e distonia, disfunção cognitiva, demência, parkinsonismo e alterações

psiquiátricas (Koide *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2001; Rolfs *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2002). Repetições entre 41 e 49 foram consideradas como uma gama intermediária, na qual existe penetrância incompleta (Doherty, Warner e Lees, 2014; Nanda *et al.*, 2007). Estas evidências não permitem, por isso, distinguir o número de repetições que resulta em patogenicidade. O número máximo de repetições reportado até à data é de 66 CAG/CAA (Maltecca *et al.*, 2003). Repetições superiores a 62 CAG/CAA geralmente dão origem à forma juvenil da doença, que progride rapidamente e leva a morte precoce. As manifestações clínicas características da forma juvenil são ataxia, deterioração intelectual, alterações psiquiátricas, fraqueza muscular, atraso no crescimento (Koide *et al.*, 1999; Maltecca *et al.*, 2003). A idade média do início dos sintomas é aos 35 anos, com um tempo de vida médio de 20 anos; no entanto, o início dos sintomas pode variar entre os 3 e os 75 anos (Monin *et al.*, 2015; Stevanin e Brice, 2008).

A neuropatologia é caracterizada por atrofia cerebral e cerebelar, com degeneração das células de Purkinje, mas também do núcleo dentado. Verifica-se atrofia de estruturas presentes nos gânglios basais: o estriado, principalmente no núcleo caudado e putâmen, e a substância nigra. Ocorre ainda neurodegeneração de estruturas corticais como hipocampo, giros cingulado e para-hipocampal e do tronco cerebral como o núcleo olivar inferior (Nakamura *et al.*, 2001; Rolfs *et al.*, 2003; Seidel *et al.*, 2012). À semelhança das outras doenças de poliglutaminas, também na SCA17 foi possível verificar a formação de agregados intranucleares de TBP mutante em várias regiões cerebrais que contêm proteínas de choque térmico e ubiquitina, assim como a proteólise da TBP mutante em fragmentos que contêm as expansões de poliglutaminas que incluem os agregados proteicos (Fujigasaki *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001). O mecanismo subjacente à SCA17 pode estar envolvido com o ganho de função tóxico conferido pela expansão de poliglutaminas ou pela desregulação da transcrição derivada da alteração genética da TBP.

## **2. Genes e Polimorfismos genéticos nas Doenças de Poliglutaminas**

O caráter monogénico das doenças de poliglutaminas torna-as candidatas ideais ao desenvolvimento de terapias génicas. A terapia génica inclui várias estratégias, das quais o silenciamento do mRNA ou edição do gene que origina a proteína mutante, parecem ser as mais atraentes, uma vez que inibem o ganho de função tóxico da proteína mutante, permitindo o ideal funcionamento das diversas regiões cerebrais afetadas da doença (Revisto por Matos *et al.*, 2018). A terapia génica pode ser realizada de duas formas; 1) edição ou silenciamento específico do alelo mutante, mantendo a tradução da proteína nativa ou, 2) por edição ou silenciamento não específico, i.e., que conduz ao silenciamento de ambos os alelos. A escolha

da terapia a utilizar deve ter em consideração a importância das funções biológicas desempenhadas pelas proteínas nativas (Rodriguez-Lebron e Paulson, 2006; Scholefield e Wood, 2009).

O facto de as doenças de poliglutaminas serem autossómicas dominantes traz consigo a elevada probabilidade de ocorrer partilha de polimorfismos de nucleótido único (SNP) entre gerações. SNPs consistem na variação de um nucleótido numa região específica da sequência de DNA que não pode ocorrer com uma frequência superior a 1% na população (Crawford e Nickerson, 2005). Estes SNPs ao se encontrarem no gene mutante, permitem distinguir os alelos normais e mutante. Indivíduos heterozigóticos para as repetições de CAG tiram vantagem das terapias de silenciamento alelo específico através dos SNPs, que surgem como uma estratégia terapêutica, uma vez que permite manter a proteína nativa e as suas funções biológicas. As abordagens utilizadas compreendem assim a ligação de uma sequência nucleotídica específica ao SNP presente no gene, no pré-mRNA ou no mRNA impedindo a finalização da tradução deste (Kay *et al.*, 2014).

## 2.1. Doença de Huntington

Localizado no braço pequeno do cromossoma 4, o gene da *HTT* estende-se por 180 kilobases (kb) no DNA genómico e compreende 67 exões que variam entre 48 pares de bases (pb) e 138 pb. A *HTT* é altamente conservada entre vertebrados e contém 3144 aminoácidos, apresentando um peso molecular de aproximadamente 348 kiloDaltons (kDa). O peso molecular da *HTT* pode variar, dependendo do número de CAGs localizados no exão 1, que se encontra após a região N-terminal, que contém 17 aminoácidos (N17) (Ambrose *et al.*, 1994; Hoogeveen *et al.*, 1993; Mcfarland e Cha, 2011; Parsons e Raymond, 2015; Zuccato, Valenza e Cattaneo, 2010). O papel crítico da região N17 foi identificada em segmentos expandidos, uma vez que promove a formação de agregados proteicos e alterações dos níveis de cálcio intracelular (Rockabrand *et al.*, 2007). A seguir à região N17, segue-se uma região rica em prolina (polyP) que contém uma hélice de prolina-prolina e apresenta uma estrutura rígida que pode dar origem à estabilização dos segmentos de poliglutaminas, promovendo a formação de inclusões (Revisto em Saudou e Humbert, 2016). A região polyP é seguida de várias unidades repetidas de cerca de 50 aminoácidos ao longo da sequência, chamadas de repetições HEAT, que é a sigla de quatro proteínas onde estas repetições se encontram: *HTT*, Fator de alongamento 3, Proteína fosfatase 2<sup>a</sup> e a quinase de levedura TOR1, que desempenham um papel importante nas interações entre proteínas e apresentam-se em 4 grupos (Andrade e Bork, 1995; Li *et al.*, 2006; Zuccato, Valenza e Cattaneo, 2010).

Lin *et al.* identificaram dois transcritos resultantes do gene da HTT, que apresentam uma diferença de 3 kb em comprimento, na região não traduzida 3' (3'UTR), mas que dão origem à mesma proteína (Lin *et al.*, 1993). Os transcritos apresentam 10,3 e 13,7 kb e encontram-se amplamente distribuídos pelos tecidos e células, ainda que, o transcrito maior foi encontrado predominantemente no cérebro (Lin *et al.*, 1993). Recentemente, foram também descritas novas variantes da HTT, com base no *splicing* alternativo; que, apesar de pouco comuns, podem ser interessantes na patogênese da HD. Isto porque cada transcrito codifica uma isoforma com funções celulares específicas e o seu estudo pode fornecer mais informação sobre a função normal da HTT, que ainda não é totalmente entendida (Hughes *et al.*, 2014; Ruzo *et al.*, 2015). Por fim, a HTT possui um sinal de exportação nuclear altamente conservado, no terminal carboxilo (aminoácidos 2397-2406) e um sinal de localização nuclear, localizado nos aminoácidos 1182-1190 (Bessert *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 2003).

Vários SNPs exônicos têm sido identificados no gene *HTT* e associados ao alelo mutante. O SNP rs149109767, por exemplo, localizado no exão 58, caracteriza-se pela deleção de 3 pb nas posições 2642-2645 (deleção do ácido glutâmico,  $\Delta 2642$ ), encontrando-se fortemente associado ao alelo expandido (ver **Figura 1** e **Tabela 2**) (Ambrose *et al.*, 1994; Novelletto *et al.*, 1994). Bilsen e colaboradores identificaram outro SNP que poderá identificar o alelo mutante de *HTT*, o SNP rs363125 (Bilsen *et al.*, 2008). Este SNP está presente no exão 39 e é caracterizado pela troca de uma adenina (A) por citosina (C) (com a C ligada à expansão de CAG). Pfister e colaboradores identificaram outro SNP (rs362307), presente na região não traduzida 3'UTR/exão 67, e com uma heterozigotia superior a 48% em indivíduos americanos e europeus com HD. No mesmo estudo, verificaram que ao alcançar de forma efetiva 3 SNPs exônicos presentes no gene *HTT* (e.g. rs363125 – exão 39, rs362273 – exão 57 e o rs362307 – 3'UTR/exão 67) poder-se-á proporcionar uma terapia alelo-específica para mais de 70% dos indivíduos com HD na população americana e europeia (Pfister *et al.*, 2009).

Para além dos SNPs exônicos, SNPs intrônicos também têm sido estudados no gene *HTT*. Um dos quais é o SNP rs7685686, um SNP intrónico localizado no intrão 42 e com o alelo A em forte associação à expansão de CAGs em doentes de origem Caucasiana (ver **Figura 1**) (Carroll *et al.*, 2011; Østergaard *et al.*, 2013).

**Tabela 2-** Polimorfismos de nucleótido único associados às expansões de CAGs na Doença de Huntington.

Doença	SNP	Posição genoma (GRCh38;p13)	Alelos População Normal (GenBank-NCBI)	Alelo Associado à Expansão CAG	Referência
Doença de Huntington NC_000004.12 NM_002111.8	rs149109767	chr4:3228684-3228696 Exão 58	Δ2642	Δ2642	(Ambrose et al., 1994; Novelletto et al., 1994; Zhang, Engelman e Friedlander, 2009)
	rs363125	chr4:3187820 Exão 39	C>A	C	(Bilsen et al., 2008; Drouet et al., 2014; Pfister et al., 2009)
	rs362307	chr4:3240118 Exão 67/3'UTR	C>T	T	(Drouet et al., 2014; Miliarikova et al., 2016; Pfister et al., 2009)
	rs362273	chr4:3225692 Exão57	A>G, T	A/G*	(Pfister et al., 2009)
	rs7685686	chr4:3205415 Intrão 42	A>G	A	(Carroll et al., 2011; Østergaard et al., 2013; Skotte et al., 2014; Southwell et al., 2014, 2018)
	rs16843804	chr4:3102663 Intrão 3	C>A, T	C	(Shin et al., 2016)
	rs1313774	chr4:3057922 A montante da região 5'UTR	T>A, C	C	(Shin et al., 2016)
	rs2857935	chr4:3073964 A montante da região 5'UTR	G>A, C, T	C	(Monteys et al., 2017)
	rs6446723	chr4:3125086 Intrão 10	T>A, C, G	T	(Southwell et al., 2014)
	rs362331	chr4:3214108 Exão 50	T>C	NA	(Drouet et al., 2014; Miller et al., 2017; Miliarikova et al., 2016)
	rs2276881	chr4:3229934 Exão 60	G>A	NA	(Drouet et al., 2014)

**Nota:** Para a HD não foram representados os SNPs que caracterizam haplótipos devido ao seu número elevado.

\*Trabalhos realizados por Pfister e colegas (2009), nos quais não houve associação alélica à expansão de CAGs. NA – Não aplicável.

Mais recentemente, vários grupos têm usado a tecnologia CRISPR-Cas9 para alvejar SNPs em HD. Exemplo disso, são os SNPs: rs16843804, localizado no intrão 3, e os rs1313774 e rs2857935, localizados a montante da região 5'UTR do gene *HTT* (Monteys *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2016). Por fim, os SNPs rs6446723 localizado no intrão 10 e os SNPs rs362331 e rs2276881 localizados no exões 50 e 60, respetivamente, também tem sido alvo de diversos estudos – ver também **Figura I** (Drouet *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2017; Miniarikova *et al.*, 2016; Southwell *et al.*, 2013, 2014, 2018).

Com base na individualidade de cada SNP é possível criar haplótipos. Um haplótipo é caracterizado por uma combinação de alelos num organismo, que são herdados em conjunto ao longo do mesmo cromossoma e permitem identificar associações fundamentais entre SNPs. No contexto de HD, Warby e colaboradores identificaram um haplótipo, constituído por 22 SNPs (rs2857936; rs12506200; rs762855; rs3856973; rs2024115; rs363081; rs363075; rs363064; rs3025849; rs363102; rs4690073; rs3025838; rs363099; rs363096; rs2298967; rs362322; rs2276881; rs362272; rs362310; rs362307; rs362303; e rs1006798), que se encontra fortemente enriquecido (95%) em doentes com HD e em indivíduos que apresentam alelos intermédios (83%) de origem europeia. Contudo, este haplótipo não foi identificado em populações presentes na China, Japão e Nigéria (Warby *et al.*, 2009). No mesmo ano, Lombardi *et al.* mostrou que mais de 86% de uma coorte de pacientes HD de origem europeia, eram heterozigóticos para pelo menos um SNP, de um conjunto de 26 SNPs presentes no gene *HTT* (Lombardi *et al.*, 2009). Através de análise combinatória, verificaram que ao alcançar de forma efetiva 7 destes SNPs (rs362331, rs35892913, rs362307, rs362267, rs2276881, rs17781557, rs363125) poder-se-á tratar mais de 85% dos doentes HD europeus.

Em 2012, um estudo levado a cabo por Lee *et al.* (2012), identificou 40 SNPs significativamente associados à expansão de CAGs na HD em indivíduos de origem europeia. Destes, destacaram-se dois SNPs fora do gene *HTT*: o SNP rs12641989, pertencente ao gene *RGS12* e o SNP rs11248108 pertencente ao gene *RNF4*, localizados a 343 e 600 kb da expansão de CAG, respetivamente. Estes dois SNPs juntos marcaram um haplótipo de aproximadamente 938 kb associado à expansão de CAGs mutante com elevada prevalência numa população de ancestralidade europeia (Lee *et al.*, 2012). No entanto, uma vez que estes SNPs se encontram a elevadas distâncias do gene em estudo, acabaram por gerar uma associação “sintética”. Assim, foram excluídos para permitir a identificação de haplótipos HD constituídos por SNPs em *HTT*. Esta alteração permitiu obter sete haplótipos HD distintos, designados HTT\_Hap\_1 a HTT\_Hap\_7, com base em 21 SNPs identificados em indivíduos de origem europeia (rs2857845; rs2471347; rs2798296; rs3856973; rs2285086; rs10015979; rs2071655; rs363082; rs363066; rs6855981; rs11731237; rs363096; rs2298969; rs363092;

rs916171; rs82333; rs110501; rs149109767; rs362272; rs2269499; rs3095073). Este haplótipo esteve presente numa região de 938 kb e no qual se encontraram aproximadamente 83% dos cromossomas HD em estudo (Lee *et al.*, 2012). Estudos posteriores, dos mesmos autores, concluíram que ao utilizar três combinações de apenas 10 SNPs: exónicos, intrónicos, ou ambos, é possível alcançar 93,8%, 97,0% ou 97,1% dos indivíduos heterozigóticos para a HD em populações europeias, respetivamente (Lee *et al.*, 2015).

Outro estudo, que incluiu um total de 3102 haplótipos, permitiu caracterizar os haplótipos mais comuns para HD em quatro populações distintas de ancestralidade europeia (Kay *et al.*, 2015). Este identificou 3 haplótipos distintos (A1, A2 e A3), como os mais relevantes para estratégia de silenciamento alelo-específico da HTT mutante (**Tabela 3**) (Kay *et al.*, 2015). O haplótipo A1 compreende três SNPs: o rs362307 (exão 67/3'UTR), o rs149109767 (exão 58) e o rs72239206 (intrão 22). O último corresponde a uma deleção intrónica de 4 pb ( $\Delta$ ACTT) que também se encontra associada à expansão de CAGs. O haplótipo A2 é composto por 5 polimorfismos que são considerados os seus marcadores específicos: rs363080 (intrão 16), rs2798235 (exão 6), rs363107 (intrão 22), rs362313 (intrão 61) e rs2530595 (exão 67/3'UTR). Por fim, o haplótipo A3 compreende um subtipo específico de SNP, chamado de A3a: rs113407847 (intrão 47). Através deste estudo, foi possível demonstrar que, ao alcançar estes 3 haplótipos, era possível tratar 80% dos pacientes de HD em populações Canadianas, Caucásicas, Suecas, Francesas e Italianas, em conjunto (Kay *et al.*, 2015). Na sequência destes trabalhos, Kay e colaboradores estenderam a análise de haplótipos em populações com ancestrais Asiáticos, Africanos, Europeus e Americanos. O objetivo de caracterizar haplótipos presentes noutras populações além da população europeia ou com ancestrais europeus, possibilita assim o desenvolvimento de terapias alelo-específicas para um maior número de doentes HD. Neste estudo, foram identificados SNP extragénicos presentes numa janela de 1,1 mega par de bases (Mb), onde se insere o gene *HTT* (chr4: 2400000-3500000), e foi avaliada a sua presença nos haplótipos anteriormente descritos (Kay *et al.*, 2015, 2019). No haplótipo A1, foram identificados 2 SNPs extragénicos: o rs140386112 e o rs76034781 – ver também **Tabela 3**. Assim, os SNPs rs362307 (exão 67/3'UTR), rs149109767 (exão 58), rs76034781 e rs140386112 do haplótipo A1 encontram-se associados a populações de origem europeia, latino-americanas e do sul da Ásia, enquanto que o SNP rs72239206 (intrão 22) está fortemente associado aos outros 4 marcadores A1 na população europeia e latino-americana, com exceção de um subconjunto na população sul asiática, na qual surge como um marcador individual (Kay *et al.*, 2019). No mesmo estudo, os 5 marcadores caracterizados anteriormente para o haplótipo A2 mantiveram-se. O SNP rs362313 (intrão 61) foi fortemente associado aos restantes marcadores em populações com ancestrais

européus e sul asiáticos. No entanto, este SNP foi associado sozinho, e de forma exclusiva, em populações com ancestrais africanos. Por fim, o haplótipo A3a manteve o SNP rs113407847 (intrão 47), encontrado populações europeias, com ancestrais europeus e sul asiáticas.

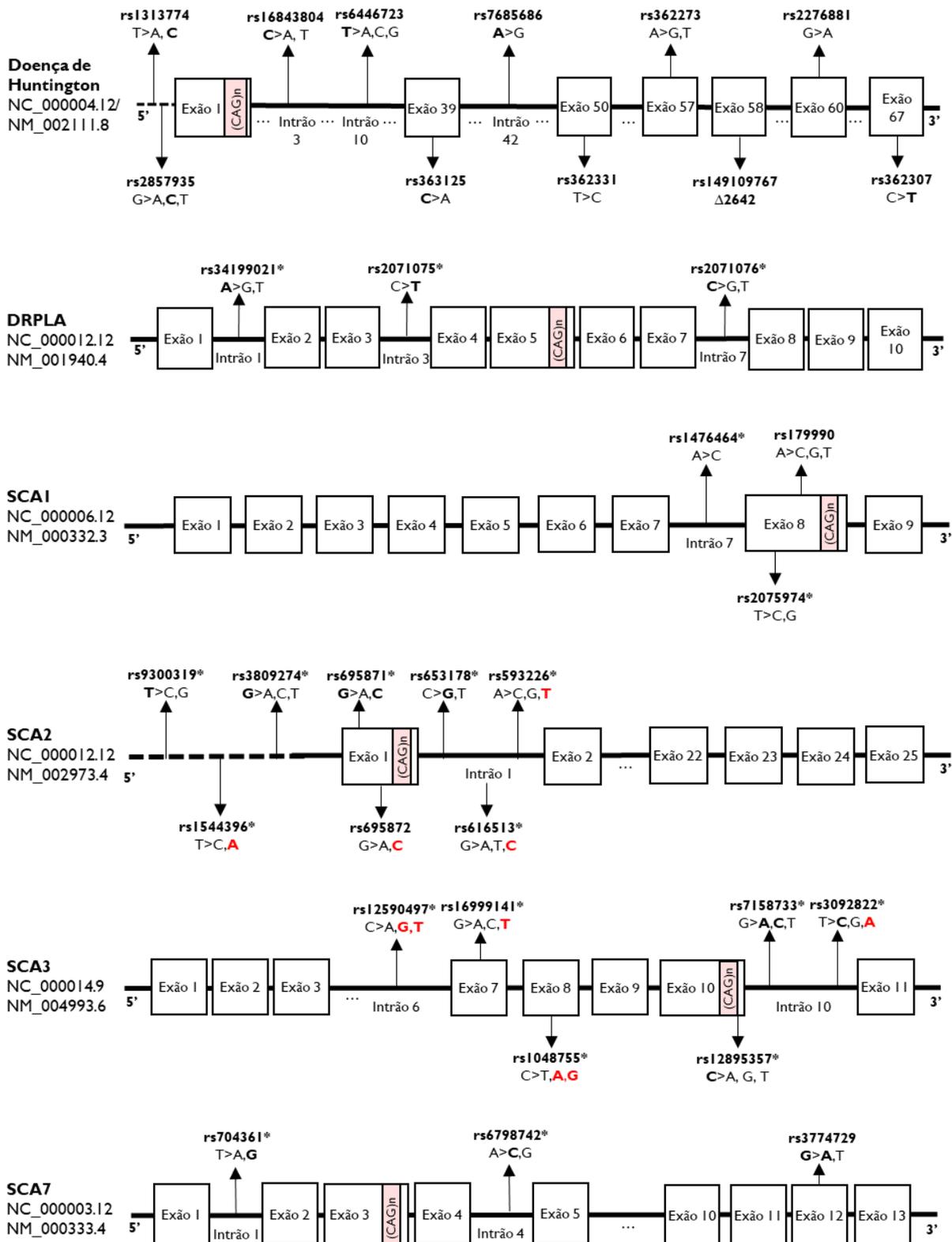
Em suma, este estudo de análise de haplótipos identificou o haplótipo A2 como o mais comum nos indivíduos HD em estudo, sendo detetado em populações sul asiáticas (57%), do oriente médio (93%) e do centro/sul de Itália (59%). Por outro lado, o haplótipo A1 apresentou maior frequência no norte de Itália (41%), onde o haplótipo A2 apresentou uma prevalência de 36% (Kay *et al.*, 2019). Em conjunto, o alcance dos haplótipos A1 e A2, como estratégia terapêutica para HD, irá permitir o tratamento a mais de 63% dos indivíduos HD nas populações onde foram identificados (ver **Tabela 3**). Ao adicionar o haplótipo A3a seria possível aumentar este número para 80%, em populações europeias e com ancestrais europeus (Kay *et al.*, 2019).

**Tabela 3-** Haplótipos descritos para HD (Kay et al., 2015, 2019).

Doença	Haplótipo	SNP Alvo	Posição genoma (GRCh38.p13)	Alélos População Normal (GenBank-NCBI)	Alélo Associado à Expansão CAG	População Identificada
Doença de Huntington NC_000004.12 NM_002111.8	A1	rs362307	chr4:3240118 Exão 67/3'UTR	C>T	T	Europa* América Latina* Sul Ásia *
		rs149109767	chr4:3228684-3228696 Exão 58	Δ2642	Δ2642	Europa* América Latina* Sul Ásia *
		rs72239206	chr4:3140934-3140939 Intrão 22	ΔACTT	ΔACTT	Europa# América Latina# Subconjunto população Sul Asiática\$
	A1 (após aumentar a janela de pesquisa para 1,1Mb)	rs140386112	chr4:3271284-3271285 Entre genes MSANTD1 e RGS12 (após gene HTT)	DupTT	DupTT	Europa* América Latina* Sul Ásia*
		rs76034781	chr4:3271055 (após gene HTT)	G>A	A	Europa* América Latina* Sul Ásia*
		rs363080	chr4:3132184 Intrão 16	C>T	T	Ancestrais Europeus* Ancestrais Sul Asiáticos*
		rs2798235	chr4:3113105 Exão 6	G>A	A	Ancestrais Europeus* Ancestrais Sul Asiáticos*
		rs363107	chr4:3142714 Intrão 22	A>G	G	Ancestrais Europeus* Ancestrais Sul Asiáticos*
		rs362313	chr4:3233862 Intrão 61	C>G, T	A	Ancestrais Europeus* Ancestrais Sul Asiáticos* Ancestrais Africanos\$
		rs2530595	chr4:3243330 Exão 67/3'UTR	C>T	T	Ancestrais Europeus* Ancestrais Sul Asiáticos*
A3a	rs113407847	chr4:3210115 Intrão 47	A>G	G	Europa Ancestrais Europeus Sul Ásia	

\*Quando os SNPs são associados em conjunto, dentro de cada haplótipo; #Quando em conjunto com os restantes 4 marcadores do haplótipo A1; \$Associação exclusiva do SNP.

**Nota:** Foi feito destaque de haplótipos mais recente, dos referidos nesta revisão.



**Figura I** - Localização dos polimorfismos de nucleótido único nas doenças de poliglutaminas.

Os SNPs apresentados representam a população normal, com base no GenBank (NCBI). SNPs indicados a **negrito** encontram-se associados à expansão de CAGs, quando aplicável. SNPs indicados a **vermelho**, encontram-se associados à expansão de CAGs e não se encontram representados no GenBank (NCBI) associados à população normal.

\* SNPs identificados que constituem haplótipos. Para a HD não foram representados os SNPs que caracterizam haplótipos devido ao seu número elevado.

## 2.2. Atrofia Muscular Bulboespinal

O gene *AR* está localizado no braço curto do cromossoma X (q11-12), é constituído por 8 exões e apresenta um comprimento superior a 90 kb (Spada *et al.*, 1991). De um modo geral, o *AR* de indivíduos normais é composto por 919 aminoácidos; no entanto, cromossomas expandidos apresentam comprimentos diferentes (Revisto por Cortes e Spada, 2018). A expansão de poliglutaminas localiza-se no primeiro exão do gene *AR* (Spada *et al.*, 1991). Como referido acima, os *AR* atuam como fatores de transcrição dependentes de ligação por androgénios (Gelman, 2002; MacLean *et al.*, 1993).

À semelhança dos outros recetores nucleares de hormonas esteróides e tiróideias, é constituído por três domínios funcionais: o domínio de transativação N-terminal, o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ligação a androgénios (Fischbeck, 2016; Spada *et al.*, 1991). O domínio de ligação ao DNA é o domínio mais conservado dentro da família dos recetores nucleares de hormonas esteróides e tiróideias e é constituído por duas *zinc fingers*, essenciais para que ocorra a ligação do *AR* a regiões regulatórias do gene alvo, conhecidas como elementos de resposta a andrógenos. Entre o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ligação a androgénios existe uma região composta por uma dobradiça. O *AR* possui um sinal de localização nuclear que se encontra entre o domínio de ligação a androgénios e a região dobradiça (aminoácidos 617-633) que tem como função realizar a translocação do *AR* para o núcleo. Também contém um sinal de exportação nuclear, responsável pela exportação do *AR* para o citoplasma, onde fica retido, na ausência de ligando, num complexo de proteínas de choque térmico. Este complexo é dissociado após a ligação de androgénios (testosterona ou di-hidrotestosterona) e permite a ativação de funções entre os terminais amina e carboxílico, que após a chegada ao núcleo e a sua dimerização interage com os elementos de resposta a andrógenos em regiões alvo, regulando a transcrição (Davey e Grossmann, 2016; Fischbeck, 2016; Matsumoto *et al.*, 2013).

Até ao momento, não foram descritos SNPs associados à expansão de poliglutaminas na SBMA. O desenvolvimento de terapias alelo específicas para a SBMA carece por isso da identificação destes polimorfismos. No entanto, vários grupos têm realizado estudos de silenciamento do *AR* mutante na DRPLA, em que o alvo são as repetições expandidas, uma estratégia terapêutica alternativa (Hirunagi *et al.*, 2021; Lieberman *et al.*, 2014; Sahashi *et al.*, 2015).

### 2.3. Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana

O gene da ATNI estende-se por aproximadamente 20 kb, é composto por 10 exões e a expansão de CAGs localiza-se no exão 5, a 1462 pb do codão de iniciação metionina (Nagafuchi *et al.*, 1994; Onodera *et al.*, 1995). Ao clonar o DNA complementar (cDNA) do gene *ATNI*, Onodera *et al.* relatou uma massa molecular prevista de 125 kDa, composta por 1185 aminoácidos (Onodera *et al.*, 1995). Também, Yazawa e colaboradores identificaram a proteína da DRPLA (*ATNI*) em cérebros humanos de adultos normais com um peso molecular de aproximadamente 190 kDa e de aproximadamente 205 kDa em cérebros de doentes DRPLA (Yazawa *et al.*, 1995). Atualmente, sabe-se que através do splicing alternativo são obtidos dois transcritos (NCBI-GenBank: NM\_001007026.2, NM\_001940.4) que codificam a mesma proteína, com 1190 aminoácidos (NCBI-ATNI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1822>).

A *ATNI* é constituída por segmentos ricos em serina, repetições de glutaminas com comprimento variável, poliprolina e uma região que compreende resíduos ácidos e básicos alternados. Por fim, contém um sinal de localização nuclear na região N-terminal e um sinal de exportação nuclear na região C-terminal (Margolis *et al.*, 1996; Nucifora *et al.*, 2003; Onodera *et al.*, 1995).

Com o objetivo de definir haplótipos associados a repetições de CAGs normais e expandidas que permitam distinguir populações, Yanagisawa e colaboradores identificaram os SNPs rs34199021 e rs2071075, localizados nos intrões 1 e 3 do gene da *ATNI*, respetivamente (ver **Figura 1** e **Tabela 4**). Assim, chamaram sistema A ao SNP rs34199021, e designaram os alelos como A1 e A2, quando estão presentes os nucleótidos A e G (guanina), respetivamente. Da mesma forma designaram sistema B ao SNP rs2071075, que compreende os alelos B1 e B2, com os nucleótidos T (timina) e C, respetivamente. O haplótipo caracterizado por A1-B1 (A\_T) foi identificado em todos os alelos com repetições de CAG na gama normal pré-expandida e expandida na população japonesa em estudo. O mesmo não se verifica em populações de origem africana. Pacientes DRPLA de origem caucasiana com repetições expandidas também apresentaram o haplótipo A1-B1 (A\_T), ao contrário dos indivíduos normais (Yanagisawa *et al.*, 1996). Mais tarde, Martins e colegas identificaram o haplótipo A1-B1 (A\_T) em todos os alelos expandidos de 4 famílias DRPLA de origem portuguesa, com um total de 12 membros (Martins *et al.*, 2003). Por outro lado, 67 indivíduos de 20 famílias de controlo raramente apresentaram este haplótipo. Também Aridon e colaboradores identificaram o haplótipo previamente descrito por Yanagisawa *et al.* em 2 famílias de origem italiana (Aridon *et al.*, 2012). Além de terem sido identificado os SNPs

previamente identificados AI-BI (A\_T) também foi adicionado outro SNP ao haplótipo anteriormente caracterizado (Yanagisawa *et al.*, 1996), o SNP rs2071076 (intrão 7). Este foi identificado em todos os indivíduos estudados portadores de doença, onde apresentou o nucleótido C associado à expansão de poliglutaminas (ver **Figura 1** e **Tabela 4**). Ao identificar o haplótipo inicialmente reportado em forte associação na população japonesa, reforça a hipótese da existência de um haplótipo comum de origem asiática (Aridon *et al.*, 2012; Yanagisawa *et al.*, 1996).

**Tabela 4- Polimorfismos de nucleótido único associados às expansões de CAGs, na DRPLA, SCA I, SCA2.**

<b>Doença</b>	<b>SNP</b>	<b>Posição genoma (GRCh38.p13)</b>	<b>Alelos População Normal (GenBank-NCBI)</b>	<b>Alelo Associado à Expansão CAG (População Identificada)</b>	<b>Referência</b>
<b>DRPLA</b> NC_000012.12 NM_001940.4	rs3419901*	chr12:6933468 Intrão 1	A>G, T	A (Japão, Portugal; Itália, População de origem Caucasiana)	(Martins et al., 2003; Yanagisawa et al., 1996)
	rs2071075*	chr12:6934323 Intrão 3	C>T	T (Japão, Portugal; Itália, População de origem Caucasiana)	(Martins et al., 2003; Yanagisawa et al., 1996)
	rs2071076*	chr12:6940836 Intrão 7	C>G, T	C (Itália)	(Aridon et al., 2012)
<b>SCA I</b> NC_000006.12 NM_000332.3	rs1476464*	chr6:16392057 Intrão 7	A>C	C (Índia)	(Mittal et al., 2005)
	rs2075974*	chr6:16327099 Exão 8	T>C,G	C (Índia)	(Mittal et al., 2005)
	rs179990	chr6:16327384 Exão 8	A>C, G, T	C (NA)	(Fischer et al., 2012)
<b>SCA2</b> NC_000012.12 NM_002973.4	rs695871*	chr12:11599196 Exão 1	G>A, C	C (Índia, China)	(Choudhry et al., 2001; Wang et al., 2015)
	rs695872	chr12:11599125 Exão 1	G>A	G (Utah com ancestrais europeus)	(Yu et al., 2005)
	rs593226*	chr12:11556082 Intrão 1	A>C,G	T (Utah com ancestrais europeus)	(Yu et al., 2005)
	rs616513*	chr12:11565579 Intrão 1	G>A,T	C (Utah com ancestrais europeus)	(Yu et al., 2005)
	rs653178*	chr12:11569952 Intrão 1	C>G,T	G (Utah com ancestrais europeus)	(Yu et al., 2005)
	rs3809274*	chr12:11606529 5' UTR	G>A,C,T	G (Utah com ancestrais europeus)	(Yu et al., 2005)
	rs1544396*	chr12:11625071 5' UTR	T>C	A (Utah com ancestrais europeus)	(Yu et al., 2005)
	rs9300319*	chr12:11627093 5' UTR	T>C,G	T (Utah com ancestrais europeus)	(Yu et al., 2005)

\* SNPs pertencentes a haplótipo; NA: não aplicável

## 2.4. Ataxia Espinocerebelosa Tipo I

O gene da ATXNI estende-se ao longo de 450 kb de DNA genómico, compreende 9 exões e a expansão de CAG encontra-se no exão 8 (Banfi *et al.*, 1994; Mittal *et al.*, 2005). A ATXNI possui um peso molecular de 98 kDa e 816 aminoácidos, que pode variar consoante o número de glutaminas incluído (Matilla-Dueñas, Goold e Giunti, 2008). Estruturalmente a ATXNI é constituída pelas seguintes regiões:

- Região de poliglutaminas variável (aminoácidos 197-226) (Chiara *et al.*, 2003);
- Região AXH (ataxina-1/HBPI) (aminoácidos 570-689), uma região altamente conservada entre a ATXNI e fator de transcrição 1 da caixa do grupo de alta mobilidade (HBPI), que permite a homodimerização da ATXNI e a sua interação com o repressor transcripcional Capicua (CIC) (Chiara *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013);
- Nos resíduos 495-605 localiza-se a região de auto-associação (Burrigh *et al.*, 1997);
- A região responsável pela atividade de ligação ao RNA, encontra-se no C-terminal, mais concretamente nos resíduos 541-767, que reduz a sua atividade, à medida que o comprimento de poliglutaminas aumenta (Yue *et al.*, 2001);
- Contém também um sinal de localização nuclear localizado nos resíduos 795-798, que promove a sua translocação para o núcleo (Klement *et al.*, 1998).

Em relação aos polimorfismos associados à expansão de CAGs, Mittal e colegas verificaram que o haplótipo “C-4-C” (rs1476464-D6S288-rs2075974) está significativamente associado à expansão de poliglutaminas em populações indianas. O SNP rs1476464, que apresenta os nucleótidos C ou A, e o alelo 4 do microssatélite D6S288 localizam-se no intrão 7, enquanto que o SNP rs2075974 apresenta os nucleótidos C ou T, localizando-se no exão 8 (ver **Figura 1** e **Tabela 4**) (Mittal *et al.*, 2005). Mais tarde, Kumaran *et al.*, ao efetuarem a caracterização genética da SCA1 de uma coorte de indivíduos do Sul da Índia identificou os SNPs acima descritos, associados à expansão de poliglutaminas (Kumaran *et al.*, 2014). Este estudo sugeriu que estes SNPs podem ser utilizados como marcadores de diagnóstico e para terapias alelo específicas. Também Fiszer e colegas trabalharam com outro polimorfismo associado à SCA1, o rs179990 (exão 8), caracterizado neste estudo, pela variação C ou T. O nucleótido T foi considerado o menor alelo, i.e. o segundo alelo mais comum na população, e ocorre com uma frequência de aproximadamente 30% nos Estados Unidos em indivíduos normais. Já o nucleótido C foi associado à expansão de CAGs -ver também **Tabela 4** (Fiszer *et al.*, 2012).

## 2.5. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2

O gene da ATXN2 é composto por 25 exões, estende-se ao longo de 147 Mb e dá origem a um transcrito com 4699 pb (Revisto em Scoles e Pulst, 2018). A expansão de CAGs encontra-se no exão 1, com um comprimento variável (Auburger, 2012). A ATXN2 de murganhos apresenta homologia na ordem de 91% com a ATXN2 humana, o que revela ser uma proteína altamente conservada entre espécies (Nechiporuk *et al.*, 1998). Estudos levados a cabo por Sanpei e colaboradores, identificaram dois codões de iniciação que dão origem a duas proteínas distintas: uma com 140kDa e 1321 aminoácidos, quando obtida a partir do primeiro codão de iniciação, e outra com 124kD e 1152 aminoácidos, quando obtido a partir do segundo codão de iniciação, localizado a montante das repetições CAG (Nechiporuk *et al.*, 1998; Sanpei *et al.*, 1996; Scoles *et al.*, 2012). A ATXN2 contém vários domínios funcionais que permitem a sua interação com várias proteínas. Os domínios Like Sm (LSm) e associados a LSm (LSmAD), localizados na região N-terminal, são domínios que apresentaram forte homologia com os domínios das proteínas Sm, que quando reunidas, conduzem à formação de ribonucleoproteínas nucleares pequenas (snRNPs) e que estão envolvidas no splicing do mRNA (Achsel, Stark e Lührmann, 2001; Neuwald e Koonin, 1998). A descoberta destes domínios evidenciou o possível envolvimento da ATXN2 no metabolismo do RNA.

Relativamente aos polimorfismos genéticos identificados no gene da ATXN2, Choudhry e a sua equipa identificaram dois SNPs exónicos no exão 1, nas posições 481 e 552 da sequência de mRNA. O SNP rs695871 contém o nucleótido G ou C, já o rs695872 possui T ou C. Através dos SNPs em estudo foram identificados dois haplótipos: o “GT” e o “CC”. O haplótipo CC mostrou estar totalmente (100%) associado à expansão de poliglutaminas numa população indiana, ao passo que está presente em apenas 29,3% dos alelos normais. O haplótipo GT foi detectado em 70,7% dos alelos normais (ver **Figura 1** e **Tabela 4**) (Choudhry *et al.*, 2001). Mais tarde, Yu e colegas reportaram uma associação significativa ente o alelo pré-expandido“(CAG) 8CAA (CAG) 4CAA (CAG) 8” com o haplótipo “TCGGGAT” constituído por 7 SNPs característico em indivíduos residentes em Utah (EUA) com ancestrais Europeus. Estes correspondem aos SNPs rs593226, rs616513 e rs653178 presentes no intrão 1, o SNP rs695871 encontrado no exão 1 após a expansão de CAG e por fim, os SNPs rs3809274, rs1544396 e rs9300319 presentes na região não traduzida 5' do gene SCA2 (Yu *et al.*, 2005).

Mais tarde, Wang e colaboradores ao estudar 5 gerações de uma família chinesa com 82 indivíduos, na qual 16 indivíduos estavam afetados por SCA2 caracterizada essencialmente por Parkinsonismo (SCA2-P) e 16 famílias diagnosticadas com SCA2 caracterizada por ataxia

(SCA2-A) identificou que todos os pacientes genotipados exibiram a presença dos SNPs rs695871 e rs695872 com o haplótipo CC-ver também **Tabela 4** (Wang *et al.*, 2015). Por outro lado, o haplótipo GT não estava presente, sugerindo que não existem diferenças entre SNPs para manifestações clínicas distintas (Wang *et al.*, 2015). Neste estudo também foram pesquisados os 7 SNPs identificados anteriormente por Yu *et al.*, que caracterizaram o haplótipo de indivíduos residentes em Utah (EUA) com ancestrais europeus, no entanto, estes não foram identificados em pacientes SCA2-A, nem SCA2-P, o que sugere a ausência desse haplótipo em doentes SCA-2 chineses (Wang *et al.*, 2015).

## 2.6. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3

O gene da ATXN3 está localizado no braço longo do cromossoma 14 e estende-se ao longo de 48 Kb. É constituído por 11 exões e a expansão de CAGs localiza-se no exão 10, na extremidade 5'. A ATXN3 apresenta um peso molecular de 42 kDa e dá origem a uma elevada variedade de transcritos e isoformas devido ao *splicing* alternativo (Bettencourt *et al.*, 2010; Ichikawa *et al.*, 2001). A forma canónica da ATXN3 corresponde à isoforma 2 (P54252-2 UniProt), contém 361 aminoácidos e é considerada a mais prevalente. Esta, é composta também por um domínio funcional na região N-terminal, o domínio Josephin, e por domínios que interagem com a ubiquitina (UniProtKB-P54252 (ATX3\_HUMAN): <https://www.uniprot.org/uniprot/P54252#P54252-2>).

O primeiro estudo que identificou os dois haplótipos mais frequentes em doentes SCA3, foi levado a cabo por Gaspar e colegas (Gaspar *et al.*, 2001). Estes haplótipos foram associados a três SNPs distintos no gene da ATXN3: o SNP rs1048755 (A<sup>669</sup>TG/G<sup>669</sup>TG) localizado no exão 8, o SNP rs12895357 (C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG) que se encontra no exão 10 e por fim o SNP rs7158733 (TAA<sup>1118</sup>/TAC<sup>1118</sup>) localizado no intrão 10 (ver **Figura 1** e **Tabela 5**) (Gaspar *et al.*, 2001; Martins e Sequeiros, 2018). O haplótipo A<sup>669</sup>C<sup>987</sup>A<sup>1118</sup> (rs1048755-rs12895357- rs7158733) foi identificado em famílias de 16 países diferentes, incluindo 4 continentes, sugerindo, a existência de um ancestral comum (Gaspar *et al.*, 2001). Além disso, este haplótipo encontrou-se presente em 72% das famílias SCA3 da população em estudo, e em apenas 2% das famílias normais (Gaspar *et al.*, 2001).

Mais tarde, um estudo mais abrangente envolvendo 20 populações de diferentes origens incluiu três SNPs adicionais: o rs12590497 (IVS6-30G>T; intrão 6), o rs16999141 (GTT<sup>527</sup>/GTC<sup>527</sup>; exão 7) e o rs3092822 (C<sup>1178</sup>/A<sup>1178</sup>; intrão 10) (Martins *et al.*, 2007). Este estudo reclassificou os dois haplótipos anteriores com base em eventos mutacionais, em: TTACAC e GTGGCA (rs12590497; G/T - rs16999141; T - rs1048755; A/G - rs12895357; C/G - rs7158733; A/C - rs3092822; C/A) que caracterizam as linhagens Joseph e Machado,

respetivamente. A nomenclatura destas linhagens tem origem na identificação das primeiras famílias com SCA3, que foram encontradas na ilha das Flores (Joseph) e de São Miguel (Machado) (Revisto por Martins e Sequeiros, 2018). O haplótipo TTACAC foi encontrado a segregar com a expansão de poliglutaminas e está altamente difundido pelo mundo. A sua presença foi relatada nos cinco continentes, em 19 populações das 20 estudadas. Este haplótipo também apresentou a maior diversidade molecular entre famílias japonesas, sugerindo que a distribuição mundial deste haplótipo tem origem asiática. Por outro lado, o haplótipo GTGGCA foi encontrado em maior frequência em famílias Portuguesas, sugerindo ser essa a sua origem (Martins *et al.*, 2007; Martins e Sequeiros, 2018; Prudencio *et al.*, 2020).

## 2.7. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 6

O gene *CACNA1A* é composto por 49 exões e dá origem à subunidade  $\alpha 1A$ , uma proteína transmembranar com um peso molecular que varia de 195 a 280 kDa e 2261-2515 aminoácidos de acordo com os transcritos obtidos. Já o fator de transcrição  $\alpha 1ACT$  é traduzido a partir da região C-terminal da subunidade  $\alpha 1A$ , dá origem a uma proteína com um peso molecular de 75 kDa (Veneziano *et al.*, 2009; Zhuchenko *et al.*, 1997).

A subunidade  $\alpha 1A$  dos canais de cálcio é composta por 4 domínios funcionais (I-IV). Cada um desses domínios é composto por seis segmentos transmembranares (S1-S6) e um segmento formador de poro. O segmento formador de poro de cada um desses domínios, interconectam-se para formar o poro central, que seletivamente permite a passagem de cálcio a partir da sua interação com regiões de afinidade (Yue *et al.*, 1997).

A investigação em torno do gene *CACNA1A*, as proteínas e mecanismos moleculares subjacentes é fundamental para um melhor entendimento sobre quais os mecanismos envolvidos na patogénese da SCA6. Até à data não foram identificados SNPs associados às repetições expandidas para a SCA6 o que inviabiliza, na totalidade, o desenvolvimento de terapias específicas de alelo com alvo aos SNPs. Mais estudos são necessários para que seja possível o desenvolvimento de terapias que permitam curar ou melhorar a vida dos doentes SCA6.

**Tabela 5-** Polimorfismos de nucleótido único associados às expansões de CAGs, na SCA3 e SCA7.

Doença	SNP	Posição genoma (GRCh38.p13)	Alelos População Normal (GenBank-NCBI)	Alelo Associado à Expansão CAG (População Identificada)	Referência
SCA3 NC_000014.9/ NM_004993.6	rs1048755*	chr14:92082441 Exão 8	C>T	A/G (América, Europa, Ásia, África, Austrália)	(Gaspar et al., 2001)
	rs12895357*	chr14:92071010 Exão 10	C>A,G,T	C (NA) C/G (Quando em haplótipo- América, Europa, Ásia, África, Austrália)	(Alves et al., 2008; Conceição et al., 2015; Fiszler et al., 2012; Li et al., 2004; Miller et al., 2003; Nóbrega et al., 2013, 2014)
	rs7158733*	chr14:92070879 Intrão 10	G>A,C,T	A/C (América, Europa, Ásia, África, Austrália)	(Gaspar et al., 2001)
	rs12590497*	chr14:92083288 Intrão 6	C>A	G/T (América, Europa, Ásia, África, Austrália)	(Martins et al., 2007)
	rs16999141*	chr14:92083242 Exão 7	G>A,C	T (América, Europa, Ásia, África, Austrália)	(Martins et al., 2007)
	rs3092822*	chr14:92070819 Intrão 10	T>C,G	C/A (América, Europa, Ásia, África, Austrália)	(Martins et al., 2007)
	rs3774729	chr3:63996406 Exão 12	G>A,T	G (Reino Unido, EUA, Norte África, Ásia) A (África do Sul)	(Stevanin et al., 1999) (Greenberg et al., 2006)
SCA7 NC_000003.12/ NM_000333.4	rs6798742*	chr3:63918083 Intrão 4	A>C,G	C (Índia, México)	(Faruq et al., 2017)
	rs704361*	chr3:63897995 Intrão 1	T>A,G	G (Ancestrais mexicanos)	(Faruq et al., 2017)

\* SNPs pertencentes a haplótipo. NA: Não aplicável

## 2.8. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 7

O gene da ATXN7 está localizado no braço longo do cromossoma 3 e estende-se ao longo de 140 kb de DNA genómico. É constituído por 13 exões e 12 intrões que variam entre 69 a 979 pb e 40 a 233 pb, respetivamente. A expansão de CAGs encontra-se no exão 3 (Michalík *et al.*, 1999). A ATXN7 contém três sinais de localização nuclear e um sinal de exportação nuclear, mas evidências indicam que as diferentes localizações entre as duas isoformas da proteína (ATXN7a com 892 aminoácidos e ATXN7b com 945 aminoácidos) se devem às diferenças entre os terminais carboxilo (Einum *et al.*, 2003). É também composta por outros domínios funcionais: domínio ATXN7 (341-400 aminoácidos), altamente conservado ao longo da evolução, um domínio *zinc-finger* (126-171) e por fim, um domínio encontrado apenas em vertebrados e definido por resíduos polares, aromáticos e carregados (705-835) (Einum *et al.*, 2003).

Ao longo dos últimos anos, têm vindo a ser identificados polimorfismos no gene da ATXN7 que se encontram em desequilíbrio de ligação com a expansão de poliglutaminas. Por exemplo, Stevanin e colaboradores identificaram o SNP rs3774729, presente no exão 12 caracterizado pela presença de uma G na posição 3145 (G<sup>3145</sup>TG) e que foi identificado predominantemente em famílias de doentes SCA7 de origem Anglo-Saxónica (Reino Unido e EUA), Ásia e do Norte de África, num estudo que envolveu 41 famílias SCA7 de diferentes origens (ver **Figura 1** e **Tabela 5**). Por outro lado, a presença de A na mesma posição (A<sup>3145</sup>TG) raramente foi associada ao alelo mutante, sendo mais frequente em famílias de doentes SCA7 Europeias (Stevanin *et al.*, 1999). Com base no mesmo SNP, Greenberg e colegas, identificaram a base adenina (A<sup>3145</sup>TG) fortemente associada a pacientes com origem sul africana (Greenberg *et al.*, 2006).

Mais tarde, estudos levados a cabo por Faruq *et al.* concluíram que o SNP intrónico localizado a aproximadamente 6 kb da extremidade 3' da repetição de CAGs, rs6798742 (intrão 4), caracterizado pela alteração do nucleótido T para C, está fortemente associado a alelos de risco e à expansão de poliglutaminas no gene da ATXN7, em populações indiana e mexicana (Faruq *et al.*, 2017). Também foi identificado um haplótipo, constituído pelos SNPs rs704361 (intrão 1) com a alteração T para G e rs6798742 (intrão 4) com a alteração de T para C, em doentes SCA7 com ancestrais mexicanos. Este haplótipo, caracterizado pelos nucleótidos G-C foi identificado em mais de 57% dos indivíduos com alelos normais pré-expandidos enquanto o haplótipo T-T foi identificado em apenas 1% (Faruq *et al.*, 2017).

## 2.9. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 17

Localizado no braço longo do cromossoma 6, o gene da TBP estende-se ao longo de aproximadamente 18Kb de DNA genómico. É composto por 8 exões e codifica duas isoformas da proteína: NM\_001172085.2 e NM\_003194.5 com 319 ou 339 aminoácidos, respetivamente (NCBI-TBP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6908>).

A TBP é constituída por um domínio N-terminal variável e um domínio C-terminal altamente conservado. O domínio N-terminal, apesar de ser variável, contém o segmento poliglutamínico conservado entre vertebrados, ainda que varie no número de repetições entre espécies (Gerber *et al.*, 1994; Hernandez, 1993; Horikoshi *et al.*, 1990; Shimada *et al.*, 1999). Este domínio modula a interação entre proteínas e permite a ligação ao DNA (Lescure *et al.*, 1994). O domínio C-terminal (180 aminoácidos) apresenta semelhanças em mais de 75% de todos os organismos, liga-se ao DNA e interage com fatores de transcrição e proteínas regulatórias (Hernandez, 1993; Nikolov *et al.*, 1992).

Apesar da investigação em torno da SCA17, atualmente ainda não foram descritos SNPs associados a esta doença, sugerindo assim, a necessidade da identificação destes polimorfismos associados à expansão de CAGs, de modo a permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

## 3. Terapias de silenciamento alelo específicas nas doenças de poliglutaminas

### 3.1. Doença de Huntington

Utilizando o silenciamento alelo específico para a HTT mutante, Bilsen e colaboradores alvejaram o SNP rs363125 (C/exão 39) (ver **Tabela 6**) (Bilsen *et al.*, 2008). Este SNP apresenta uma citosina associada à expansão de CAG, enquanto o alelo normal contém adenina (Bilsen *et al.*, 2008). Através da utilização de um RNA de interferência pequeno (siRNA) contra este SNP foi possível reduzir os níveis de mRNA do alelo mutante em aproximadamente 80%, mantendo a expressão habitual do alelo normal, em fibroblastos de um paciente HD. O mesmo se verificou para os níveis de proteína obtidos. Já Zhang, Engelman e Friedlander utilizaram um siRNA que tinha como alvo o SNP rs149109767 ( $\Delta$ 2642/exão 58), que reduziu a expressão do mRNA da HTT mutante em 51%, e demonstrando seletividade do silenciamento apenas do alelo mutante em fibroblastos de paciente HD (Zhang, Engelman e Friedlander, 2009). Estudos posteriores realizados por Carroll *et al.* demonstraram que a diminuição dos níveis da HTT mutante pode também ser alcançada de forma potente e seletiva através do

desenvolvimento de oligonucleótidos antisense (ASOs) modificados que tinham como alvo o SNP rs7685686 (intrão 42), cuja base A, está associado à expansão de CAGs. Estes estudos foram realizados em linhas de murganhos transgênicos BACHD, caracterizados por expressar a HTT mutante humana completa (Gray *et al.*, 2008) e em linhas de murganhos transgênicos YAC18, que expressa a HTT humana completa e normal, neste caso, contendo apenas 18 repetições de glutaminas (Carroll *et al.*, 2011). Foi obtido o silenciamento da HTT mutante na ordem dos 53%, enquanto apenas aproximadamente 4% da proteína nativa foi silenciada (ver também **Tabela 6**). Já Østergaard e colaboradores, no seguimento dos trabalhos de Carroll *et al.*, demonstraram que ao realizar alterações químicas em posições específicas de ASOs é possível incrementar a seletividade e a potência para o SNP rs7685686 (A/intrão 42), permitindo uma diminuição dos níveis de transcrito-alvo e da proteína mutante num modelo de murganho HD completamente humanizado (Hu97/18) (Southwell *et al.*, 2013), sem alterar a expressão do alelo normal (Østergaard *et al.*, 2013). Através deste estudo, seria possível o tratamento alelo-específico de aproximadamente 49% das populações caucasianas portadoras de HD (Østergaard *et al.*, 2013).

Em 2014, Drouet e colegas desenvolveram oito shRNA (do inglês short hairpin RNA) que tinham como alvo os 8 polimorfismos que surgem dos 4 SNPs presentes na região codificante do gene da HTT, ou seja: rs363125 (exão 39, A ou C) rs362331 (exão 50, C ou T), rs2276881 (exão 60, A ou G) e rs362307 (3'UTR/exão 67; C o T). Através da injeção de vetores lentivirais que expressavam a HTT mutante e o SNP alvo no estriado de murganhos adultos, e após administração dos shRNAs específicos para os SNPs rs362331 (exão 50, C ou T) e rs2276881 (exão 60, A ou G), foi possível verificar eficácia e seletividade do silenciamento alelo específico, através da redução dos níveis de mRNA da HTT mutante na ordem dos 80%, em comparação com os controlos, após 4 semanas de tratamento. Também se verificou a diminuição do tamanho da lesão e do número de agregados de HTT, após oito semanas de tratamento. Já os shRNAs específicos para os SNPs rs363125 (exão 39, A ou C) e rs362307 (exão 67 C o T) apesar de também terem mostrado eficácia ao alcançar os SNPs alvo, não foram seletivos ao apresentar uma degradação do alelo oposto em cerca de 80% (ver **Tabela 6**) (Drouet *et al.*, 2014).

No mesmo ano, Skotte e colegas realizaram modificações químicas em ASOs que foram avaliados em sistemas de triagem baseados na sua seletividade, toxicidade e diminuição dos níveis de HHT mutante mantendo os níveis normais, em culturas primárias de fibroblastos humanos HD. O alvo foi o SNP rs7685686\_A/G (A/intrão 42) e foram identificados dois ASOs, A38 e A39. Ao estudar estes candidatos em culturas primárias de neurónios de murganhos HD humanizados (Hu97/18), observou-se que estes ASOs permitiriam uma terapêutica de

silenciamento alelo específico para 48,7% da população de HD sequenciada anteriormente (Carroll *et al.*, 2011; Skotte *et al.*, 2014). Por outro lado, caso fosse considerada uma terapêutica silenciamento alelo não específico para pacientes homozigóticos rs7685686\_A/A, 44,9% também poderiam ser tratados. Assim, a utilização destas duas terapêuticas em conjunto permitiria o tratamento de 93,6% dos pacientes de HD, na população em estudo. Quanto aos 6,4% de pacientes que não poderiam ser alcançados por estes ASOs, 3,8% seriam heterozigóticos, apresentando uma guanina no alelo mutante (rs7685686\_G/A) e 2,6% seriam homozigóticos com guanina em ambos (rs7685686\_G/G) (Skotte *et al.*, 2014). Através do desenvolvimento de dois ASOs, X1 e X2, análogos aos anteriores, foi possível observar o *knockdown* da HTT mutante em neurónios primários de murganhos YAC128 (que contêm um transgene humano mutante com uma guanina em rs7685686 e gene homólogo HTT normal de murganho endógeno). Este trabalho mostrou que dois ASOs que têm como alvo duas variantes alélicas do SNP rs7685686, poderiam permitir o tratamento para todos os pacientes de HD de origem europeia (Carroll *et al.*, 2011; Skotte *et al.*, 2014).

Outros estudos, realizados em modelos de murganhos HD humanizados (Hu97/18), permitiram identificar 4 novos ASOs quimicamente modificados que silenciam a HTT mutante de forma potente e seletiva através de uma injeção intracerebroventricular, pelo menos durante 16 semanas (Southwell *et al.*, 2014). Três destes ASOs tiveram como alvo o SNP rs7685686 (A/intrão 42) e um ASO teve como alvo o SNP rs6446723 (T/intrão 10). Foi verificada a redução da HTT mutante em valores superiores a 79% e inferiores a 8% para a proteína nativa. Ambos apresentaram boa atividade, quando administrados em doses pequenas, boa tolerabilidade e seletividade, mesmo quando administrados em doses elevadas, o que lhes conferiu características promissoras para o desenvolvimento de uma terapia para HD (ver **Tabela 6**) (Southwell *et al.*, 2014). Em 2016, Miniarikova *et al.* otimizou micro-RNAs (miRNAs) artificiais, nos quais teve em consideração parâmetros como a eficácia do silenciamento da HTT mutante, a seletividade de alelo e o padrão de processamento de pri-miRNAs (Miniarikova *et al.*, 2016). Os alvos deste estudo foram a isoforma T e C do SNP rs362331 (exão 50) e a isoforma T do SNP rs362307 (exão 67). Neste estudo, as variantes otimizadas dos miSNP50C e o miSNP50T, quando avaliados de forma independente, silenciaram de forma efetiva e seletiva a HTT mutante em valores superiores a 80%. Já a variante otimizada do miSNP67T além de apresentar valores mais baixos para o silenciamento da HTT mutante (50-60%), também apresentou baixa seletividade no gera. Este estudo verificou que ao otimizar miRNAs artificiais é possível incrementar a sua seletividade e eficácia de silenciamento e selecionar um melhor candidato para o desenvolvimento de terapias para a HD (Miniarikova *et al.*, 2016).

Shin e colegas foram os primeiros a utilizar o sistema CRISPR-Cas9 para edição génica *in vitro* específica para o alelo mutante da HTT, tirando partido dos SNPs, em fibroblastos de pacientes HD. Esta estratégia teve como alvo dois SNPs associados aos alelos mutantes e a locais PAM: SNPs rs1313774 (C/montante da região 5'UTR) e rs16843804 (C/intrão 3). Através de duas guias de RNA (sgRNA) com alvo aos SNPs, foi possível eliminar a região promotora, o local de início da transcrição e a expansão de poliglutaminas do gene da HTT mutante que levou à inativação completa e seletiva do alelo mutante evitando a produção do mRNA e da proteína mutante (Shin *et al.*, 2016). A primeira prova de conceito *in vivo* com sistemas CRISPR-Cas9 foi demonstrada por Monteys e colegas ao utilizarem a estratégia de edição específica do alelo mutante. Para o efeito desenvolveram uma sgRNA que alvejou o SNP rs2857935 (C/montante da região 5'UTR) combinada com uma guia de ligação ao intrão I da HTT, que, em conjunto com a acção da *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) resultou no silenciamento específico do mRNA da HTT mutante em fibroblastos de doentes HD. No mesmo estudo, murganhos BACHD injetados com vírus adenoassociados (AAV) que expressaram o complexo sgRNA/Cas9 seletivo para o alelo mutante anteriormente descrito, mostraram redução dos níveis de mRNA HTT mutante humana em 40% nos hemisférios tratados-ver também **Tabela 6** (Monteys *et al.*, 2017).

Na sequência dos trabalhos de Pfister e colegas, Miller *et al.* (2017) usando siRNAs encapsulados em partículas de glucano, realizaram estudos com base em 3 SNPs: rs362331 (T/exão 50), rs362273 (A/exão 57) e rs362307 (T/exão 67/3'UTR) com as seguintes taxas de heteroziguidade: C/T-39,4%, A/G-35,2% e C/T-48,6%, respetivamente (Miller *et al.*, 2017; Pfister *et al.*, 2009). Ensaio *ex vivo* com células mielóides primárias de pacientes HD heterozigóticos para o SNP rs362331 (T/exão 50) mostraram seletividade quando testados para cada alelo, i.e. quando o alvo foi o nucleótido T, observou-se a redução dos níveis de proteína em 74% e apenas 17% de supressão do alelo C. Por outro lado, quando o alvo foi o nucleótido C, resultou na diminuição da expressão proteica em 63%, enquanto para o alelo T se verificou 30% (Miller *et al.*, 2017). Os mesmos resultados não foram alcançados para os SNPs rs362273 ou rs362307 nas mesmas condições, ao mostrarem baixa seletividade. Este estudo sugere que os SNPs alvos escolhidos para terapia devem ser os que apresentam maior seletividade, ao contrário dos que apresentam maior prevalência (Miller *et al.*, 2017), uma vez que o SNP rs362307 (T/exão 67/3'UTR) foi considerado por Pfister *et al.* o mais prevalente em populações americanas e europeias com HD (Pfister *et al.*, 2009). Mais recentemente, Southwell e colegas testaram ASOs alelo-específico contra os SNPs rs7685686 (A/intrão 42) e rs6446723 (G/intrão 10), em murganhos Hu97/18 (Southwell *et al.*, 2018). Dos ASOs avaliados neste estudo, o que tinha como alvo o SNP rs7685686 (A/intrão 42) mostrou ser o

mais ativo na supressão seletiva da HTT mutante (89%) sem afetar o alelo normal, com uma duração de ação superior a 46 semanas numa avaliação de um ano. Além disto, foi observada não só a restauração, como a prevenção de défices cognitivos e psiquiátricos, tanto no tratamento precoce, como tardio da doença (ver **Tabela 6**) (Southwell *et al.*, 2018).

**Tabela 6 - Polimorfismos de nucleótido único identificados na doença de Huntington e a sua aplicação em abordagens alelo específicas.**

SNP Alvo	Nucleótido Alvo	Localização no genoma	Estratégia	Modelo	Efeito molecular	Referência
rs363125	C	Exão 39	siRNA	Fibroblastos de um paciente com HD	Redução seletiva dos níveis de mRNA da HTT mutante (~80%)	(Bilsen et al., 2008)
rs149109767	Δ2642	Exão 58	siRNA	Fibroblastos de pacientes HD	Redução seletiva da expressão do mRNA da HTT mutante em 51%; Não foram observadas alterações significativas nos níveis de mRNA do alelo normal	(Zhang, Engelman e Friedlander, 2009)
rs7685686	A	Intrão 42	ASOs	Murganhos transgênicos BACHD e YAC18	Redução dos níveis da HTT mutante <i>in vivo</i> em 53% e HTT nativa em 4%	(Carroll et al., 2011)
rs7685686	A	Intrão 42	ASOs	Murganhos Hu97/18	Redução dos níveis de mRNA e proteína do alelo mutante	(Østergaard et al., 2013)
rs363125	A/C	Exão 39	shRNA	Murganhos adultos injetados com vetores lentivirais que codificaram para HTT mutante com o SNP alvo	Níveis de mRNA da HTT cerca de 80% inferior aos controles; redução agregada e volume da lesão no estriado (verificado para os SNPs rs362331 e rs2276881)	(Drouot et al., 2014)
rs362331	C/T	Exão 50				
rs2276881	A/G	Exão 60				
rs362307	C/T	Exão 67/3'UTR				
rs7685686	A/G	Intrão 42	ASOs	Neurónios primários de murganhos Hu97/18 e YAC128	Redução dos níveis de mRNA superior a 79%	(Skotte et al., 2014)
rs7685686	A	Intrão 42	ASOs	Murganhos transgênicos Hu97/18	Redução dos níveis de mRNA e da proteína mutante.	(Southwell et al., 2014)
rs6446723	T	Intrão 10				
rs362331	C/T	Exão 50	miRNA	Células embrionárias de rim humano (HEK) 293T	Silenciamento da HTT mutante (~80%) de forma seletiva	(Minianikova et al., 2016)
rs362307	T	Exão 67/3'UTR	miRNA		Silenciamento da HTT mutante (50-60%), apresentando baixa seletividade	
rs1313774	C	A montante da região 5'UTR Intrão 3	CRISPR-Cas9	Fibroblastos de pacientes HD	Inativação completa e seletiva do alelo mutante	(Shin et al., 2016)
rs16843804	C					
rs2857935	G/C	A montante da região 5'UTR	CRISPR-Cas9	Fibroblastos de doentes HD; Murganhos transgênicos BACHD	Silenciamento seletivo do mRNA da HTT mutante Redução do mRNA da HTT mutante em 40% no estriado de murganhos tratados	(Monteys et al., 2017)
rs362331	C/T	Exão 50	siRNA (em sistemas de partículas de glucano)	Células mielóides primárias de pacientes HD	Silenciamento potente e seletivo da HTT para cada alelo, quando avaliados individualmente (Alelo alvo T-Knockdown: T=74% C=17%; Alelo alvo C-Knockdown: C=63% T=30%) (verificado para o rs362331)	(Miller et al., 2017)
rs3627273	A/G	Exão 57				
rs362307	C/T	Exão 67/3'UTR				
rs7685686	A	Intrão 42	ASO	Murganhos transgênicos Hu97/18	Supressão seletiva da HTT mutante (89%) sem afetar o alelo normal; Restauração e prevenção de défices cognitivos e psiquiátricos	(Southwell et al., 2018)

**Nota:** Polimorfismos indicados a **negrito** representam o nucleótido associado à expansão de poliglutaminas, quando aplicável.

### 3.2. Ataxia Espinocerebelosa Tipo I

Com o objetivo de silenciar especificamente o mRNA mutante da ATXN1, Fiszer e colegas desenharam 4 siRNAs que tinham como alvo o SNP rs179990 (C/exão 8) localizado a aproximadamente 250 nucleótidos da expansão de poliglutaminas. Os 4 siRNAs deste estudo tinham incompatibilidades com o alelo normal em diferentes posições nucleotídicas: posição 9 (G9), 10 (G10), 11 (G11) e 16 (G16). Quando testados em fibroblastos de pacientes SCA1, todos os siRNAs reduziram os níveis de transcrito mutante até 60%. Ainda assim, o siRNA “G10” ao mostrar a melhor performance, foi testado em diferentes concentrações (2nM, 10nM, 50nM e 200nM) (Fiszer *et al.*, 2012). Quando em elevadas concentrações (200nM), foi observada uma redução dos níveis de mRNA em aproximadamente 20% e 60% para os alelos normal e mutante, respectivamente (ver **Tabela 7**) (Fiszer *et al.*, 2012).

### 3.3. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3

Utilizando o silenciamento alelo específico para a ATXN3, Miller e os seus colegas (2007) tiraram partido do SNP rs12895357 (C/exão 10) para desenhar um siRNA específico para o silenciamento da expressão da ATXN3 mutante (ver **Tabela 7**) (Miller *et al.*, 2003). Este estudo foi realizado em modelos celulares (células COS-7 e células HeLa), que continham o alelo mutante com a base C no SNP rs12895357, e demonstrou uma diminuição seletiva da expressão da ATXN3 mutante em 92,6%, preservando o alelo normal (93,6%) (Miller *et al.*, 2003). Também Li e colaboradores tiraram partido deste SNP para desenvolver um siRNA com o qual obtiveram uma redução da ATXN3 mutante e normal de 96% e de 5,9%, respectivamente, em culturas celulares (células HEK293T) (Li *et al.*, 2004).

A primeira prova de conceito *in vivo* foi levada a cabo por Alves *et al.*, onde se verificou o silenciamento eficaz e seletivo da ATXN3 mutante mediado por vetores lentivirais que codificavam um shRNA que alcançou o mesmo SNP (rs12895357-C/exão 10), em modelos de murganho SCA3 desenvolvidos com recurso a vetores lentivirais (Alves *et al.*, 2008). O silenciamento da ATXN3 mutante foi acompanhado pela diminuição da neuropatologia característica, apresentando uma redução da formação e acumulação de agregados em aproximadamente 50% e a preservação do marcador neuronal DARPP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina) em aproximadamente 70%- ver também **Tabela 7** (Alves *et al.*, 2008). Uns anos mais tarde, Fiszer e a sua equipa utilizaram fibroblastos de pacientes SCA3 para demonstrar a eficiência do silenciamento e seletividade para o alelo mutante do siRNA desenvolvido. Ao alcançar do SNP rs12895357 (C/exão 10) indicado acima, foi possível obter uma redução da ATXN3 mutante em cerca de 80%, preservando o ATXN3 normal em 60%

(Fischer *et al.*, 2012). Mais tarde, Nóbrega e colegas (2013) mostraram a recuperação da coordenação motora e dos défices neuropatológicos em murganhos transgênicos SCA3 que expressam a ATXN3 humana com 69 repetições de CAGs e um fenótipo precoce severo (Nóbrega *et al.*, 2013). Isto foi possível através do silenciamento específico da proteína mutante através de um lentivírus que codificou um shRNA que tinha como alvo o SNP rs12895357 (C/exão 10) (Nóbrega *et al.*, 2013). Em trabalhos posteriores, Nóbrega *et al.* (2014) mostrou que o silenciamento da ATXN3 mutante antes do desenvolvimento de sintomas, atrasa muito significativamente o desenvolvimento dos défices motores e neuropatológicos característicos da SCA3, sugerindo esta abordagem como uma possível terapia para o tratamento desta doença (Nóbrega *et al.*, 2014).

Partículas lipídicas de ácido nucleico estáveis (SNALP) consistem numa abordagem não viral de entrega de ácidos nucleicos e mais segura em relação à entrega mediada por vírus, tornando-se por isso atrativa (Conceição *et al.*, 2015). Conceição e colegas, ao desenvolver um SNALP encapsulando siRNAs que alvejam o SNP rs12895357 (C/exão 10) em modelos de murganhos transgênicos SCA3, alcançaram eficaz e seletivamente a ATXN3 mutante *in vivo*, o que resultou não só na redução do mRNA da ATXN3 mutante e dos níveis de agregados de proteína em 32%, mas também na redução dos défices motores e da neuropatologia, através de administração intravenosa (Conceição *et al.*, 2015).

Recentemente foi demonstrado que a expressão prolongada (20 semanas após injeção) de shRNA codificados por vetores lentivirais com alvo ao o SNP rs12895357 (C/exão 10), não conduziu a efeitos tóxicos *in vivo*, sugerindo ser uma estratégia terapêutica segura (Nóbrega *et al.*, 2019).

**Tabela 7 - Polimorfismos de nucleótido único identificados nas Ataxias Espinocerebelosas e a sua aplicação em abordagens alelo específicas.**

Doença	SNP Alvo	Nucleótido alvo	Localização no genoma	Mecanismo	Modelo	Efeito molecular	Efeito fenotípico	Referência
<b>SCA1</b>	rs179990	C	Exão 8	siRNA	Fibroblastos de pacientes SCA1	Redução dos níveis de mRNA em ~20% e 60% para os alelos normal e mutante, respetivamente	NA	(Fischer et al., 2012)
<b>SCA3</b>	rs12895357	C	Exão 10	siRNA	Modelos celulares (células COS-7 e células HeLa) que contêm o SNP	Diminuição seletiva da expressão da ATXN3 mutante (92,6%) mutante preservando o alelo normal (93,6%)	NA	(Miller et al., 2003)
	rs12895357	C	Exão 10	siRNA	Células HEK293T transfetadas com plasmídeos que contêm o SNP	Redução seletiva da ATXN3 mutante e normal em 96% e de 5,9%	NA	(Li et al., 2004)
	rs12895357	C	Exão 10	shRNA	Modelo de murganho SCA3 induzido com vetores lentivirais que codificam a ATXN3 mutante humana	Silenciamento seletivo da ATXN3 mutante; Redução dos agregados em ~50% e preservação de DARPP-32 em ~70%	NA	(Alves et al., 2008)
	rs12895357	C	Exão 10	siRNA	Fibroblastos de doentes SCA3	Redução da ATXN3 mutante em ~80%, mantendo 60% ATXN3 normal	NA	(Fischer et al., 2012)
	rs12895357	C	Exão 10	shRNA	Modelo de murganho transgénico SCA3	Silenciamento seletivo ATXN3 mutante e redução dos défices neuropatológicos (diminuição do nível de agregados em ~66%)	Recuperação da coordenação motora	(Nóbrega et al., 2013)
	rs12895357	C	Exão 10	shRNA	Modelo de murganho transgénico SCA3	Silenciamento precoce da ATXN3 mutante reduz défices neuropatológicos característicos	Prevenção do desenvolvimento dos défices motores	(Nóbrega et al., 2014)
	rs12895357	C	Exão 10	SNALP contendo siRNAs	Modelo de murganho transgénico SCA3	Redução dos níveis de mRNA e proteína mutante em 32% e da neuropatologia	Redução dos défices motores	(Conceição et al., 2015)
<b>SCA7</b>	rs3774729	A	Exão 12	siRNA; micro-RNA artificial	Células HEK293T transfetadas com plasmídeo contendo o SNP	Redução seletiva dos níveis de ATXN7 mutante (~90%)		(Scholefield et al., 2009)
	rs3774729	A	Exão 12	siRNA	Fibroblastos de pacientes SCA7	Redução dos níveis de mRNA mutante (49%), mantendo o mRNA ATXN7 nativa (75%)		(Scholefield et al., 2014)

NA - Não aplicável.

### 3.4. Ataxia Espinocerebelosa Tipo 7

Com o objetivo de testar o silenciamento alelo específico em SCA7, Scholefield e colegas (2006) tiraram partido do SNP rs3774729 (A/exão 12) identificado em mais de 50% dos doentes SCA7 de origem sul africana (Greenberg *et al.*, 2006; Scholefield *et al.*, 2009). Para o efeito otimizaram um shRNA e um micro-RNA artificial cujas sequências alvejam o SNP rs3774729 (A/exão 12) (ver **Tabela 7**). Ambas as estratégias foram testadas em células HEK293T transfetadas com um plasmídeo que expressava a ATXN7 mutante e respectivo SNP, resultando na diminuição dos níveis de proteína mutante e do número de agregados, mantendo quase a totalidade dos níveis da ATXN7 nativa. Ensaio realizado com shRNA (shR-PI6) demonstraram uma redução do transcrito ATXN7 mutante em 93% a apenas 26% do transcrito normal. Já os ensaios realizados com o micro-RNA artificial (miR-PI6) mostraram valores semelhantes aos obtidos com o shRNA, reduzindo os transcritos ATXN7 mutante cerca de 90%, e apenas 25% do transcrito normal (Scholefield *et al.*, 2009). Este estudo mostrou que terapias com base no RNA de interferência podem representar uma estratégia terapêutica para a SCA7. Mais tarde e para o mesmo SNP (rs3774729-A/exão 12), testaram a performance do o shR-PI6 desenvolvido em estudos anteriores (Scholefield *et al.*, 2009), em fibroblastos de doentes SCA7 (Scholefield *et al.*, 2014). Como resultado da técnica alelo específico, verificou-se a redução dos níveis de transcrito mutante e normal na ordem dos 49% e 25%, respetivamente-ver também **Tabela 7** (Scholefield *et al.*, 2014).

**Atualmente não existem terapias de silenciamento alelo específicas para as restantes doenças de poliglutaminas. Na SBMA, SCA6 e SCA17 será necessário, em primeiro lugar, a identificação de SNPs associados à expansão de poliglutaminas para que seja possível o desenvolvimento de terapias alelo específicas. Já para a DRPLA e SCA2, uma vez que já foram identificados SNPs associados à expansão anómala, é necessário investigar o impacto e a viabilidade das terapias alelo específicas.**

## **Conclusão**

O carácter monogénico das doenças de poliglutaminas facilitam o desenvolvimento de terapias génicas. Assim, a identificação dos SNPs associados à expansão anómala em cada uma destas doenças surge como uma poderosa ferramenta para alcançar de forma seletiva apenas o alelo mutante. Deste modo, neste trabalho foi possível reunir não só os SNPs que se encontram associados às repetições expandidas, em cada uma das doenças de poliglutaminas, mas também as terapias de silenciamento alelo específicas já levadas a cabo por diversos grupos de investigação que se debruçam sobre este tema.

É importante salientar que a SBMA, a SCA6 e SCA17, até ao momento, não têm quaisquer SNPs identificados associados à expansão de poliglutaminas. Este facto inviabiliza totalmente o desenvolvimento de terapias alelo específicas com alvo aos SNPs. Outra limitação importante nesta abordagem, comum a todas as doenças de poliglutaminas, é a ausência de um SNP que se encontre presente em todos os indivíduos, dentro de cada doença. Este facto, limita o tratamento ao nível global, uma vez que os diferentes SNPs são essencialmente caracterizados de acordo com a sua localização geográfica.

Uma vez que não existe tratamento eficaz para estas doenças, torna-se imperativo não só o a descoberta e investigação em torno dos SNPs associados à expansão anómala, como também uma melhor compreensão das consequências que podem resultar do silenciamento inespecífico, isto é, silenciamento do alelo normal, caso ocorram. Para isso, serão necessários mais estudos, principalmente nas doenças menos prevalentes, consequentemente menos estudadas, que carecem de informação crucial para o desenvolvimento destas terapias.

## Bibliografia

ACHSEL, T.; STARK, H.; LÜHRMANN, R. - **The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. . ISSN 00278424. 98:7 (2001) 3685–3689.

ADACHI, Hiroaki *et al.* - **Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients**. Brain. ISSN 00068950. 128:3 (2005) 659–670.

ALVES, Sandro *et al.* - **Allele-Specific RNA Silencing of Mutant Ataxin-3 Mediates Neuroprotection in a Rat Model of Machado- Joseph Disease**. PLoS ONE. 3:10 (2008) e3341. doi: 10.1371/journal.pone.0003341.

AMATO, A. A. *et al.* - **Kennedy ' s disease: A clinicopathologic correlation with mutations in the androgen receptor gene**. Neurology. 43:4 (1993) 791–794. doi: 10.1212/wnl.43.4.791.

AMBROSE, Christine M. *et al.* - **Structure and expression of the Huntington's disease gene: Evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat**. Somatic Cell and Molecular Genetics. ISSN 07407750. 20:1 (1994) 27–38.

ANDRADE, Miguel A.; BORK, Peer - **HEAT repeats in the Huntington's disease protein**. Nature Genetics. 11 (1995) 115–116. doi: 10.1038/ng1095-115

ARBIZU, T. *et al.* - **A family with adult spinal and bulbar muscular atrophy, X-linked inheritance and associated testicular failure**. Journal of the Neurological Sciences. 59:3 (1983) 371–382.

ARIDON, Paolo *et al.* - **Dentatorubral-Pallidoluysian Atrophy: Haplotype of Asian Origin in 2 Italian Families**. Movement Disorders. ISSN 08853185. 27:3 (2012) 457–458.

AUBURGER, Georg W. J. - **Spinocerebellar ataxia type 2**. Em: SUBRAMONY, S. H., DÜRR, A., Handbook of Clinical Neurology- Ataxic Disorders. 1. ed. [S.l.] : Elsevier B.V., 2012, ISBN 978-0-444-51892-7. p. 423–436.

BANFI, S. *et al.* - **Mapping and cloning of the critical region for the spinocerebellar ataxia type I gene (SCA1) in a yeast artificial chromosome contig spanning 1.2 Mb**. Genomics. ISSN 08887543. 18:3 (1993) 627–635.

BANFI, Sandro *et al.* - **Identification and characterization of the gene causing type I spinocerebellar ataxia**. Nature Genetics. ISSN 15461718. 7:4 (1994) 513–520.

BARBEAU, André - **Parental Ascent In The Juvenile Form Of Huntington's Chorea**. The Lancet. 2:7679 (1970) 937. doi: 10.1016/s0140-6736(70)92119-7.

BATES, Gillian P. *et al.* - **Huntington disease**. Nature Reviews Disease Primers. ISSN 2056676X. 1 (2015) 1–21.

BER, Isabelle Le *et al.* - **Prevalence of dentatorubral-pallidoluysian atrophy in a large series of white patients with cerebellar ataxia**. Archives of Neurology. ISSN 00039942. 60:8 (2003) 1097–1099.

BESSERT, Denise A. *et al.* - **The identification of a functional nuclear localization signal in the Huntington disease protein**. Molecular Brain Research. ISSN 0169328X. 33:1 (1995) 165–173.

BETTENCOURT, Conceição *et al.* - **Increased transcript diversity: Novel splicing**

**variants of Machado-Joseph Disease gene (ATXN3).** *Neurogenetics.* . ISSN 13646745. 11:2 (2010) 193–202.

BILSEN, P. H. J. Va. *et al.* - **Identification and allele-specific silencing of the mutant huntingtin allele in Huntington's disease patient-derived fibroblasts.** *Human Gene Therapy.* ISSN 10430342. 19:7 (2008) 710–719.

BREZA, Marianthi; KOUTSIS, Georgios - **Kennedy ' s disease (spinal and bulbar muscular atrophy): a clinically oriented review of a rare disease.** *Journal of Neurology.* ISSN 1432-1459. 266:3 (2019) 565–573.

BROWN, Carolyn J. *et al.* - **Androgen receptor (AR) gene CAG trinucleotide repeat length associated with body composition measures in non-syndromic obese, non-obese and Prader-Willi syndrome individuals.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* ISSN 15737330. 44 (1989) 264–269.

BÜRK, K. *et al.* - **Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: Oculomotor abnormalities in families with SCA1, SCA2, and SCA3.** *Journal of Neurology.* ISSN 03405354. 246:9 (1999) 789–797.

BURNETT, Barrington; LI, Fusheng; PITTMAN, Randall N. - **The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity.** *Human Molecular Genetics.* . ISSN 09646906. 12:23 (2003) 3195–3205.

BURRIGHT, Eric N. *et al.* - **Identification of a self-association region within the SCA1 gene product, ataxin-I.** *Human Molecular Genetics.* ISSN 09646906. 6:4 (1997) 513–518.

CARROLL, Jeffrey B. *et al.* - **Potent and Selective Antisense Oligonucleotides Targeting Single-Nucleotide Polymorphisms in the Huntington Disease Gene / Allele-Specific Silencing of Mutant Huntingtin.** *Molecular Therapy.* ISSN 1525-0016. 19:12 (2011) 2178–2185.

CASEY, Hannah L.; GOMEZ, Christopher M. - **Spinocerebellar Ataxia Type 6** In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A: *GeneReviews®.* Seattle: University of Washington, 1998, atualizado em 21 Novembro. [Acedido a 12 Abril 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1140/>>

CATTERALL, W. - **Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels.** *Annual Review of Immunology.* ISSN 0732-0582. 22:1 (2004) 485–501.

CHAHIN, Nizar; SORENSON, Eric J. - **Serum creatine kinase levels in spinobulbar muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis.** *Muscle and Nerve.* ISSN 0148639X. 40:1 (2009) 126–129.

CHAI, Yaohui *et al.* - **Poly-ubiquitin Binding by the Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Links Its Normal Function to Protein Surveillance Pathways.** *Journal of Biological Chemistry.* ISSN 00219258. 279:5 (2004) 3605–3611.

CHIARA, C. De *et al.* - **The AXH module: An independently folded domain common to ataxin-I and HBPI.** *FEBS Letters.* ISSN 00145793. 551:1–3 (2003) 107–112.

CHOUDHRY, Shweta *et al.* - **CAG repeat instability at SCA2 locus: Anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms.** *Human Molecular Genetics.* ISSN 09646906. 10:21 (2001) 2437–2446.

CHUNG, M. Y. *et al.* - **Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I.** *Nature genetics.* 5:3 (1993) 254–258.

doi: 10.1038/ng1193-254.

CONCEIÇÃO, Mariana *et al.* - **Intravenous administration of brain-targeted stable nucleic acid lipid particles alleviates Machado-Joseph disease neurological phenotype.** *Biomaterials.* . ISSN 0142-9612. 82:2015) 124–137.

CORTES, Constanza J.; SPADA, Albert R. La - **X-Linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy: From Clinical Genetic Features and Molecular Pathology to Mechanisms Underlying Disease Toxicity.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, *Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology* v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 103–134.

COSTA, Maria C.; PAULSON, Henry L. - **Toward understanding Machado – Joseph disease.** *Progress in Neurobiology.* ISSN 0301-0082. 97:2 (2012) 239–257.

COUTINHO, Paula; ANDRADE, Corino - **Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands.** *Neurology.* 28:7 (1978) 703–709. doi: 10.1212/wnl.28.7.703.

CRAWFORD, Dana C.; NICKERSON, Deborah A. - **Definition and clinical importance of haplotypes.** *Annual Review of Medicine.* 56 (2005) 303–320. doi: 10.1146/annurev.med.56.082103.104540.

DANTONEL, Jean-Christophe *et al.* - **The TBP-like factor : an alternative transcription factor in Metazoa ?.** *Trends in Biochemical Sciences.* 24:9 (1999) ISSN 0968-0004, 335–339.

DAVEY, Rachel A.; GROSSMANN, Mathis - **Androgen Receptor Structure , Function and Biology : From Bench to Bedside.** *Clinical Biochemist Reviews.* 37:1 (2016). PMID: 27057074 PMCID: PMC4810760, 3–15.

DAVID, Gilles *et al.* - **Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy ( SCA7 ).** *Human Molecular Genetics.* 7:2 (1998) 165–170. doi: 10.1093/hmg/7.2.165

DIALLO, Alhassane *et al.* - **Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study.** *The Lancet Neurology.* . ISSN 14744465. 17:4 (2018) 327–334.

DIFIGLIA, Marian *et al.* - **Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain.** *Science.* ISSN 00368075. 277:5334 (1997) 1990–1993.

DOHERTY, Karen M.; WARNER, Thomas T.; LEES, Andrew J. - **Late Onset Ataxia: MSA-C or SCA 1? A Gene Penetrance Dilemma.** *Movement Disorders.* 29:1 (2014) 36–38. doi: 10.1002/mds.25770.

DONALDSON, Kathryn M. *et al.* - **Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* ISSN 00278424. 100:15 (2003) 8892–8897.

DORSMAN, J. C. *et al.* - **Interruption of perfect CAG repeats by CAA triplets improves the stability of glutamine-encoding repeat sequences.** *Biotechniques.* 33:5 (2002) 976–978. doi: 10.2144/02335bm01

DROUET, Valérie *et al.* - **Allele-specific silencing of mutant huntingtin in rodent brain and human stem cells.** *PLoS ONE.* 9:6 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0099341.

DU, Xiaofei *et al.* - **Second cistron in CACNA1A gene encodes a transcription factor**

**mediating cerebellar development and SCA6.** Cell. . ISSN 10974172. 154:1 (2013) 118.

DU, Xiaofei; GOMEZ, Christopher Manuel - **Spinocerebellum ataxia type 6: Molecular mechanisms and calcium channel genetics.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 147–173.

DU, Xiaofei; SEMLER, Bert L.; GOMEZ, Christopher M. - **Revelations from a bicistronic calcium channel gene.** Cell Cycle. ISSN 15514005. 13:6 (2014) 875–876.

DÜRR, Alexandra *et al.* - **Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: Clinical, molecular, and neuropathological features.** Annals of Neurology. ISSN 03645134. 39:4 (1996) 490–499.

EGOROVA, Polina A.; BEZPROZVANNY, Ilya B. - **Molecular Mechanisms and Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 2.** Neurotherapeutics. 16 (2019) 1050–1073. doi: 10.1007/s13311-019-00777-6

EINUM, David D. *et al.* - **A novel central nervous system-enriched spinocerebellar ataxia type 7 gene product.** Archives of Neurology. ISSN 00039942. 60:1 (2003) 97–103.

ELDEN, Andrew C. *et al.* - **Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS.** Nature. 466:7310 (2010) 1069–1075. doi: 10.1038/nature09320.Ataxin-2.

ESTRADA, Rafael *et al.* - **Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): Morphometric analyses in 11 autopsies.** Acta Neuropathologica. ISSN 00016322. 97:3 (1999) 306–310.

FARUQ, Mohammed *et al.* - **A Complete Association of an intronic SNP rs6798742 with Origin of Spinocerebellar Ataxia Type 7-CAG Expansion Loci in the Indian and Mexican Population.** Annals of Human Genetics. ISSN 14691809. 81:5 (2017) 197–204.

FERNANDEZ, M. *et al.* - **Late-onset SCA2: 33 CAG repeats are sufficient to cause disease.** Neurology. ISSN 00283878. 55:4 (2000) 569–572.

FISCHBECK, Kenneth H. - **Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Overview.** Journal of molecular neuroscience. 58:3 (2016) 317–320. doi: 10.1007/s12031-015-0674-7.

FISHER, Emily R.; HAYDEN, Michael R. - **Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: Prevalence and population at risk.** Movement Disorders. ISSN 08853185. 29:1 (2014) 105–114.

FISZER, Agnieszka *et al.* - **An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases.** BMC Molecular Biology. (2012). doi: 10.1186/1471-2199-13-6

FUJIGASAKI, H. *et al.* - **CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia.** Brain. 124:Pt 10 (2001) 1939–1947. doi: 10.1093/brain/124.10.1939

GARCÍA-VELÁZQUEZ, Lizbeth E. *et al.* - **Founder effect and ancestral origin of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) mutation in Mexican families.** Neurogenetics. ISSN 13646753. 15:1 (2014) 13–17.

GARDEN, Gwenn A. *et al.* - **Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Promotes Non-Cell-Autonomous Purkinje Cell Degeneration and Displays Proteolytic Cleavage in Ataxic Transgenic Mice.** The Journal of Neuroscience. 22:12 (2002) 4897–4905. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-12-04897.2002.

GASPAR, C. *et al.* - **Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation : A Worldwide Haplotype Study**. *American Journal of Human Genetics*. 68:2 (2001) 523–528. doi: 10.1086/318184.

GATCHEL, Jennifer R.; ZOGHBI, Huda Y. - **Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles**. *Nature Reviews Genetics*. ISSN 14710056. 6:10 (2005) 743–755.

GELMANN, Edward P. - **Molecular biology of the androgen receptor**. *Journal of Clinical Oncology*. ISSN 0732183X. 20:13 (2002) 3001–3015.

GERBER, Hans-Peter *et al.* - **Transcriptional Activation Modulated by Homopolymeric Glutamine and Proline Stretches**. *Science*. 263:5148 (1994) 808–81. doi: 10.1126/science.8303297

GESCHWIND, D. H. *et al.* - **Spinocerebellar ataxia type 6**. *Neurology*. 49:5 (2016) 1247–1251. doi: 10.1016/B978-0-12-809324-5.00795-1.

GESCHWIND, Daniel H. *et al.* - **The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia**. *American Journal of Human Genetics*. . ISSN 00029297. 60:4 (1997) 842–850.

GHOSH, Rhia; TABRIZI, Sarah J. - **Huntington disease. Molecular biology of Huntington's disease**. Em: GESCHWIND, D. H., PAULSON, H. L., KLEIN, C., *Handbook of Clinical Neurology - Neurogenetics, Part I*. I. ed. USA: Elsevier, 2018. ISBN 9780444632333 p. 255–278.

GHOSH, Rhia; TABRIZI, Sarah J. - **Clinical Features of Huntington ' s Disease**. Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, *Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology v. 1049*. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 1–28.

GIUNTI, P. *et al.* - **Molecular and Clinical Study of 18 Families with ADCA Type II: Evidence for Genetic Heterogeneity and De Novo Mutation**. *American Journal of Human Genetics*. 64:6 (1999) 1594–1603. doi: 10.1086/302406.

GLOBAS, C. *et al.* - **The cerebellum and cognition: Intellectual function in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)**. *Journal of Neurology*. ISSN 03405354. 250:12 (2003) 1482–1487.

GOMEZ, Christopher M. *et al.* - **Spinocerebellar ataxia type 6: Gaze-evoked and vertical nystagmus, Purkinje cell degeneration, and variable age of onset**. *Annals of Neurology*. ISSN 03645134. 42:6 (1997) 933–950.

GRAY, Michelle *et al.* - **Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice**. *Journal of Neuroscience*. ISSN 02706474. 28:24 (2008) 6182–6195.

GREENBERG, Jacquie *et al.* - **Origin of the SCA7 gene mutation in South Africa: Implications for molecular diagnostics [I]**. *Clinical Genetics*. ISSN 00099163. 70:5 (2006) 415–417.

GRIGGS, Robert C.; NUTT, John G. - **Episodic ataxias as channelopathies**. *Annals of Neurology*. ISSN 15318249. 37:3 (1995) 285–287.

GRUNSEICH, C.; RINALDI, C.; FISCHBECK, K. H. - **Spinal and bulbar muscular atrophy : pathogenesis and clinical management**. *Oral diseases*. 20:1 (2014) 6–9. doi: 10.1111/odi.12121.

HARDING, A. E. *et al.* - **X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: A report of ten**

cases. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. ISSN 00223050. 45:11 (1982) 1012–1019.

HAYASHI, Masahiro; KOBAYASHI, Katsuji; FURUTA, Hisakazu - **Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado – Joseph disease**. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 57:2 (2003) 205–213. doi: 10.1046/j.1440-1819.2003.01102.x.

HAYASHI, Yasuko *et al.* - **Hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy: Detection of widespread ubiquitinated neuronal and glial intranuclear inclusions in the brain**. *Acta Neuropathologica*. ISSN 00016322. 96:6 (1998) 547–552.

HE, Weihai; PARKER, Roy - **Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing**. *Current Opinion in Cell Biolology*. 12:3 (2000) 346–350. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00098-3.

HELMLINGER, Dominique *et al.* - **Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes**. *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 13:12 (2004) 1257–1265.

HELMLINGER, Dominique *et al.* - **Glutamine-Expanded Ataxin-7 Alters TFTC / STAGA Recruitment and Chromatin Structure Leading to Photoreceptor Dysfunction**. *PLoS Biology*. 4:3 (2006) e67. doi: 10.1371/journal.pbio.0040067.

HERNANDEZ, N. - **TBP, a universal eukaryotic transcription factor?**. *Genes and Development*. 7:7B (1993) 1291–1308. doi: 10.1051/medsci/2004205575

HILLMAN, D. *et al.* - **Localization of P-type calcium channels in the central nervous system**. *Neurobiology*. 88:16 (1991) 7076–7080. doi: 10.1073/pnas.88.16.7076

HIRUNAGI, Tomoki *et al.* - **Selective suppression of polyglutamine-expanded protein by lipid nanoparticle-delivered siRNA targeting CAG expansions in the mouse CNS**. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. ISSN 21622531. 24 (2021) 1–10.

HOLMBERG, Monica *et al.* - **Localization of autosomal dominant cerebellar ataxia associated with retinal degeneration and anticipation to chromosome 3p12-p21.1**. *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 4:8 (1995) 1441–1445.

HOLMBERG, Monica *et al.* - **Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): A neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions**. *Human Molecular Genetics*. . ISSN 09646906. 7:5 (1998) 913–918.

HOOGEVEEN, André T. *et al.* - **Characterization and localization of the huntington disease gene product**. *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 2:12 (1993) 2069–2073.

HORIKOSHI, Masami *et al.* - **Analysis of structure-function relationships of yeast TATA box binding factor TFIID**. *Cell*. 61:7 (1990) 1171–1178. doi: 10.1016/0092-8674(90)90681-4

HUGHES, Alis C. *et al.* - **Identification of novel alternative splicing events in the huntingtin gene and assessment of the functional consequences using structural protein homology modelling**. *Journal of Molecular Biology*. ISSN 10898638. 426:7 (2014) 1428–1438.

HUGHES, Robert E.; OLSON, James M. - **Therapeutic opportunities in polyglutamine disease**. *Nature Medicine*. ISSN 10788956. 7:4 (2001) 419–423.

HUYNH, Duong P. *et al.* - **Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death**. *Human Molecular Genetics*. . ISSN 09646906. 12:13 (2003) 1485–1496.

ICHIKAWA, Y. *et al.* - **The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene**. *Journal of Human Genetics*. ISSN 14345161. 46:7 (2001) 413–422.

IGARASHI, Shuichi *et al.* - **Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch.** *Nature Genetics*. 18 (1998) 111–117. doi: 10.1038/ng0298-111

IKEUCHI, Takeshi *et al.* - **Dentatorubral-pallidolusian atrophy: Clinical features are closely related to unstable expansions of trinucleotide (CAG) repeat.** *Annals of Neurology*. ISSN 15318249. 37:6 (1995) 769–775.

IMBERT, Georges *et al.* - **Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats.** *Nature Genetics*. ISSN 10614036. 14:3 (1996) 285–291.

ISHIKAWA, K. *et al.* - **Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1.** *American Journal of Human Genetics*. ISSN 00029297. 61:2 (1997) 336–346.

JENSEN, Kelsey; BEYLERGIL, Sinem Balta; SHAIKH, Aasef G. - **Slow saccades in cerebellar disease.** *Cerebellum Ataxia*. 6:1 (2019) 1–9. doi: 10.1186/s40673-018-0095-9

JOHANSSON, Jenni *et al.* - **Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation.** *Human Molecular Genetics*. 7:2 (1998) 171–176. doi: 10.1093/hmg/7.2.171

KANAZAWA, Ichiro - **Dentatorubral-pallidolusian atrophy or Naito-Oyanagi disease.** *Neurogenetics*. ISSN 13646745. 2:1 (1998) 1–17.

KANAZAWA, Ichiro - **Dentatorubral-pallidolusian atrophy or Naito-Oyanagi disease.** *Neurogenetics*. ISSN 13646745. 2 (1998) 1–17.

KANAZAWA, Ichiro - **Molecular pathology of dentatorubral-pallidolusian atrophy.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. ISSN 09628436. 354:1386 (1999) 1069–1074.

KARAM, Alice; TROTTIER, Yvon - **Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, *Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology* v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 197–218.

KAWAGUCHI, Yoshiya *et al.* - **CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1.** *Nature Genetics*. . ISSN 15461718. 8:3 (1994) 221–228.

KAY, C. *et al.* - **Personalized gene silencing therapeutics for Huntington disease.** *Clinical Genetics*. . ISSN 13990004. 86:1 (2014) 29–36.

KAY, Chris *et al.* - **Huntingtin Haplotypes Provide Prioritized Target Panels for Allele-specific Silencing in Huntington Disease Patients of European Ancestry.** *Molecular Therapy*. 23:11 (2015) 1759–1771. doi: 10.1038/mt.2015.128.

KAY, Chris *et al.* - **A Comprehensive Haplotype Targeting Strategy for Allele-specific HTT Suppression in Huntington Disease.** *American Journal of Human Genetics*. 105:6 (2019) 1112–1125. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.10.011.

KIESEWETTER, S. *et al.* - **Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease.** *Nature genetics*. 4:4 (1993) 393–397. doi: 10.1038/ng0893-393.

KILLORAN, Annie *et al.* - **Characterization of the Huntington intermediate CAG repeat expansion phenotype in PHAROS.** *Neurology*. ISSN 00283878. 80:22 (2013) 2022–2027.

KIM, Eunji *et al.* - **Structural basis of protein complex formation and reconfiguration by polyglutamine disease protein ataxin-1 and Capicua.** *Genes and Development*. . ISSN 08909369. 27:6 (2013) 590–595.

KLEMENT, Ivan A. *et al.* - **Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: Role in polyglutamine- induced disease in SCA1 transgenic mice.** *Cell*. ISSN 00928674. 95:1 (1998) 41–53.

KLOCKGETHER, Thomas; MARIOTTI, Caterina; PAULSON, Henry L. - **Spinocerebellar ataxia.** *Nature Reviews Disease Primers*. ISSN 2056676X. 5:1 (2019) 1–21.

KLOSTERMANN, Wolfgang *et al.* - **Slow saccades and other eye movement disorders in spinocerebellar atrophy type I.** *Journal of Neurology*. ISSN 03405354. 244:2 (1997) 105–111.

KOIDE, R. *et al.* - **Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA).** *Nature Genetics*. ISSN 15461718. 6:1 (1994) 9–13.

KOIDE, Reiji *et al.* - **A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene : a new polyglutamine disease ?.** *Human Molecular Genetics*. 8:11 (1999) 2047–2053. doi: 10.1093/hmg/8.11.2047

KOMURE, O. *et al.* - **Dna analysis in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy: Correlation between cag repeat length and phenotypic variation and the molecular basis of anticipation.** *Neurology*. ISSN 1526632X. 45:1 (1995) 143–149.

KORDASIEWICZ, Holly B. *et al.* - **C-termini of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity.** *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 15:10 (2006) 1587–1599.

KOUTELOU, Evangelia; HIRSCH, Calley L.; DENT, Sharon Y. R. - **Multiple faces of the SAGA complex.** *Current Opinion in Cell Biolology*. 22:3 (2011) 374–382. doi: 10.1016/j.ceb.2010.03.005.Multiple.

KOUTSIS, Georgios *et al.* - **Case Report From Mild Ataxia to Huntington Disease Phenocopy: The Multiple Faces of Spinocerebellar Ataxia 17.** *Case reports in neurological medicine*. 643289 (2014). doi: 10.1155/2014/643289.

KRYSA, Wioletta *et al.* - **High relative frequency of SCA1 in Poland reflecting a potential founder effect.** *Neurological Sciences*. ISSN 15903478. 37 (2016) 1319–1325.

KUMARAN, Dhanya *et al.* - **Genetic characterization of Spinocerebellar ataxia 1 in a South Indian cohort.** *BMC Medical Genetics*. ISSN 14712350. 15:1 (2014) 1–8.

LAHUNTA, Alexander; GLASS, Eric - **Chapter 5 - Lower Motor Neuron: Spinal Nerve, General Somatic Efferent System.** Em: LAHUNTA, Alexander; GLASS, Eric, *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. 3. ed.. USA: Elsevier Inc., 2009. ISBN 978-0-7216-6706-5. p. 77–133.

LANDWEHRMEYER, G. Bernhard *et al.* - **Huntington's disease gene: Regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals.** *Annals of Neurology*. ISSN 15318249. 37:2 (1995) 218–230.

LEE, Jong Min *et al.* - **Common SNP-based haplotype analysis of the 4p16.3 Huntington disease gene region.** *American Journal of Human Genetics*. ISSN 00029297. 90:3

(2012) 434–444.

LEE, Jong Min *et al.* - **Sequence-Level Analysis of the Major European Huntington Disease Haplotype**. *American Journal of Human Genetics*. ISSN 15376605. 97:3 (2015) 435–444.

LESCURE, Alain *et al.* - **The N-terminal domain of the human TATA-binding protein plays a role in transcription from TATA- containing RNA polymerase II and III promoters**. *The EMBO Journal*. 13:5 (1994) 1166–1175. PMID: 7510635 PMCID: PMC394926

LI, Mei *et al.* - **Nuclear Inclusions of the Androgen Receptor Protein in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy**. *Annals of Neurology*. 44:2 (1998) 249–254. doi: 10.1002/ana.410440216

LI, S. H. *et al.* - **Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues**. *Neuron*. ISSN 08966273. 11:5 (1993) 985–993.

LI, Wei *et al.* - **Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein**. *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 1083351X. 281:23 (2006) 15916–15922.

LI, Yi *et al.* - **Sequence-Dependent and Independent Inhibition Specific for Mutant Ataxin-3 by Small Interfering RNA**. *Annals of Neurology*. 56:1 (2004) 124–129. doi: 10.1002/ana.20141.

LIEBERMAN, Andrew P. *et al.* - **Peripheral androgen receptor gene suppression rescues disease in mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy**. *Cell Reports*. 7:3 (2014) 774–784. doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.008.

LIEBERMAN, Andrew P.; SHAKKOTTAI, Vikram G.; ALBIN, Roger L. - **Polyglutamine Repeats in Neurodegenerative Diseases**. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. ISSN 15534014. 14:1 (2019) 1–27.

LIN, Blaoyang *et al.* - **Differential 3' polyadenylation of the huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression**. *Human Molecular Genetics*. . ISSN 09646906. 2:10 (1993) 1541–1545.

LOMBARDI, Maria Stella *et al.* - **A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference**. *Experimental Neurology*. ISSN 00144886. 217:2 (2009) 312–319.

MACLEAN, H. E. *et al.* - **Related individuals with different androgen receptor gene deletions**. *Journal of Clinical Investigation*. ISSN 00219738. 91:3 (1993) 1123–1128.

MALTECCA, F. *et al.* - **Intergenerational instability and marked anticipation in SCA-17**. *Neurology*. 61:10 (2003) 1441–1443. doi: 10.1212/01.wnl.0000094123.09098.a0.

MARGOLIS, Russell L. *et al.* - **DRPLA gene (Atrophin-1) sequence and mRNA expression in human brain**. *Molecular Brain Research*. ISSN 0169328X. 36:2 (1996) 219–226.

MARIOTTI, Caterina *et al.* - **Phenotypic manifestations associated with CAG-repeat expansion in the androgen receptor gene in male patients and heterozygous females: A clinical and molecular study of 30 families**. *Neuromuscular Disorders*. ISSN 09608966. 10:6 (2000) 391–397.

MARTIANOV, Igor; VIVILLE, Stephane; DAVIDSON, Irwin - **RNA Polymerase II Transcription in Murine Cells Lacking the TATA Binding Protein**. *Science*. 298:5595 (2002) 1036–1039. doi 10.1126/science.1076327

MARTIN, Jean Jacques - **Spinocerebellar ataxia type 7**. Em: SUBRAMONY, S. H., DÜRR,

A., Handbook of Clinical Neurology- Ataxic Disorders. I. ed. [S.l.] : Elsevier B.V., 2012, ISBN 978-0-444-51892-7. p. 475–491.

MARTINS, Sandra *et al.* - **Portuguese families with dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) share a common haplotype of Asian origin.** European Journal of Human Genetics. . ISSN 10184813. 11:10 (2003) 808–811.

MARTINS, Sandra *et al.* - **Asian Origin for the Worldwide-Spread Mutational Event in Machado-Joseph Disease.** S. 64:10 (2007) 1502–1509. doi: 10.1001/archneur.64.10.1502

MARTINS, Sandra; SEQUEIROS, Jorge - **Origins and spread of machado-joseph disease ancestral mutations events.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 243–254.

MARUYAMA, Hirofumi *et al.* - **Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: A study of 1,286 Japanese patients.** American Journal of Medical Genetics. ISSN 15524841. 114:5 (2002) 578–583.

MATILLA-DUEÑAS, Antoni; GOOLD, Robert; GIUNTI, Paola - **Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1.** Cerebellum. ISSN 14734222. 7:2 (2008) 106–114.

MATILLA, Antoni *et al.* - **Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation.** Journal of Neuroscience. ISSN 02706474. 18:14 (1998) 5508–5516.

MATOS, Carlos A. *et al.* - **Gene therapies for polyglutamine diseases.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 395–438.

MATOS, Carlos; ALMEIDA, Luís P.; NÓBREGA, Clévio - **Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions.** Journal of Neurochemistry. 148 (2019) 8–28. doi: 10.1111/jnc.14541.

MATSUMOTO, Takahiro *et al.* - **The androgen receptor in health and disease.** Annual Review of Physiology. ISSN 00664278. 75 (2013) 201–224.

MATSUYAMA, Z. *et al.* - **Direct alteration of the P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel property by polyglutamine expansion in spinocerebellar ataxia 6.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. ISSN 15292401. 19:12 (1999).

MCFARLAND, Karen N.; CHA, Jang Ho J. - **Molecular biology of Huntington's disease.** Em: GESCHWIND, D. H., PAULSON, H. L., KLEIN, C., Handbook of Clinical Neurology - Neurogenetics, Part I. I. ed. USA: Elsevier, 2018. ISBN 9780444632333 p.25-81

MCLOUGHLIN, Hayley S.; MOORE, Lauren R.; PAULSON, Henry L. - **Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases.** Neurobiology of Disease.Vol. 134, Elsevier Inc. ISSN 0969-9961 (2020) 104635

MENDONÇA, Nuno *et al.* - **Clinical Features of Machado-Joseph Disease.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 255–273.

MHATRE, Anand N. *et al.* - **Reduced transcriptional regulatory competence of the**

**androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy.** *Nature genetics.* 5 (1993) 184–188. doi: 10.1038/ng1093-184

MICHALÍK, A. *et al.* - **Genomic organisation of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) gene responsible for autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration.** *Human Genetics.* ISSN 03406717. 105:5 (1999) 410–417.

MICHALIK, A.; MARTIN, J-J; BROECKHOVEN, C. Van - **Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy.** *European Journal of Human Genetics.* 12:1 (2004) 2–15. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201108.

MILLER, James R. C. *et al.* - **Allele-selective suppression of mutant huntingtin in primary human blood cells.** *Scientific Reports.* ISSN 20452322. 7 (2017) 1–7.

MILLER, Victor M. *et al.* - **Allele-specific silencing of dominant disease genes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100:12 (2003) 7195–7200. doi: 10.1073/pnas.1231012100.

MINIARIKOVA, Jana *et al.* - **Design, Characterization, and Lead Selection of Therapeutic miRNAs Targeting Huntingtin for Development of Gene Therapy for Huntington's Disease.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids.* ISSN 21622531. 5:3 (2016) e297.

MITTAL, Uma *et al.* - **Insights into the mutational history and prevalence of SCA1 in the Indian population through anchored polymorphisms.** *Human genetics.* ISSN 03406717. 118:1 (2005) 107–114.

MONIN, Marie-Lorraine *et al.* - **Survival and severity in dominant cerebellar ataxias.** *Annals of clinical and translational neurology.* 2:2 (2015) 202–207. doi: 10.1002/acn3.156.

MONTEYS, Alex Mas *et al.* - **CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo.** *Molecular Therapy.* ISSN 15250024. 25:1 (2017) 12–23.

MUÑOZ, E. *et al.* - **Intranuclear inclusions, neuronal loss and CAG mosaicism in two patients with Machado-Joseph disease.** *Journal of the Neurological Sciences.* ISSN 0022510X. 200:1–2 (2002) 19–25.

NAGAFUCHI, Shigeo *et al.* - **Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA).** *Nature Genetics.* ISSN 15461718. 8:2 (1994) 177–182.

NAKAMURA, Koichiro *et al.* - **SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein.** *Human Molecular Genetics.* 10:14 (2001) 1441–1448. doi: 10.1093/hmg/10.14.1441.

NANDA, Ashish *et al.* - **Case of spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17) associated with only 41 repeats of the TATA-binding protein (TBP) gene.** *Movement Disorders.* 22:3 (2007) 436. doi: 10.1002/mds.21275.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - **ATNI atrophin 1 [ Homo sapiens (human) ]** . Maryland: U.S. National Library of Medicine, actual. 4 Julho 2021. [Consult. 2 Agosto 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1822>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - **TBP TATA-box binding protein [ Homo sapiens (human) ]** . Maryland: U.S. National Library of Medicine, actual. 28 Agosto 2021. [Consult. 03 Setembro 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6908>

NECHIPORUK, Tamilla *et al.* - **The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression.** Human Molecular Genetics. ISSN 09646906. 7:8 (1998) 1301–1309.

NEDELSKY, Natalia B. *et al.* - **Native functions of the androgen receptor are essential to pathogenesis in a Drosophila model of spinobulbar muscular atrophy.** Neuron. 67:6 (2010) 936–952. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.034.Native.

NEUWALD, Andrew F.; KOONIN, Eugene V. - **Ataxin-2, global regulators of bacterial gene expression, and spliceosomal snRNP proteins share a conserved domain.** Journal of Molecular Medicine. . ISSN 09462716. 76:1 (1998) 3–5.

NIEWIADOMSKA-CIMICKA, Anna; TROTTIER, Yvon - **Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7.** Neurotherapeutics. ISSN 18787479. 16:4 (2019) 1074–1096.

NIKOLOV, Dimitar B. *et al.* - **Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein.** Nature. 360 (1992) 40–16. doi: doi.org/10.1038/360040a0

NÓBREGA, Clévio *et al.* - **Silencing Mutant Ataxin-3 Rescues Motor Deficits and Neuropathology in Machado-Joseph Disease Transgenic Mice.** PLoS ONE. 8:1 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0052396.

NÓBREGA, Clévio *et al.* - **RNA Interference Mitigates Motor and Neuropathological Deficits in a Cerebellar Mouse Model of Machado-Joseph Disease.** PLoS ONE. 9:8 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0100086.

NÓBREGA, Clévio *et al.* - **Molecular Mechanisms and Cellular Pathways Implicated in Machado-Joseph Disease Pathogenesis.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 349–367.

NÓBREGA, Clévio *et al.* - **RNA Interference Therapy for Machado-Joseph Disease: Long-Term Safety Profile of Lentiviral Vectors Encoding Short Hairpin RNAs Targeting Mutant Ataxin-3.** Human Gene Therapy. ISSN 15577422. 30:7 (2019) 841–854.

NOVELLETTO, Andrea *et al.* - **Polymorphism analysis of the huntingtin gene in italian families affected with huntington disease.** Human Molecular Genetics. ISSN 09646906. 3:7 (1994) 1129–1132.

NUCIFORA, Frederick C. *et al.* - **Nuclear localization of a non-caspase truncation product of atrophin-1, with an expanded polyglutamine repeat, increases cellular toxicity.** Journal of Biological Chemistry. ISSN 00219258. 278:15 (2003) 13047–13055.

OGATA, A. *et al.* - **Expression of androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis.** Journal of Neurology, Neurosurgery, and psychiatry. 57:10 (1994) 1274–1275. doi: 10.1136/jnnp.57.10.1274.

ONODERA, O. *et al.* - **Molecular cloning of a full-length cDNA for dentatorubral-pallidoluysian atrophy and regional expressions of the expanded alleles in the CNS.** American Journal of Human Genetics. ISSN 00029297. 57:5 (1995) 1050–1060.

OPAL, Puneet; ASHIZAWA, Tetsuo - **Spinocerebellar Ataxia Type 1.** In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A: GeneReviews®. Seattle: University of Washington, 1998, atualizado em 22 Junho 2017. [Acedido a 19 agosto 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1184>

OPHOFF, Roel A. *et al.* - **Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4.** *Cell*. ISSN 00928674. 87:3 (1996) 543–552.

ORR, H. T. *et al.* - **Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type I.** *Nature genetics*. 4:3 (1993) 221–226. doi: 10.1038/ng0793-221.

ORTIZ, Judit M. Pérez; ORR, Harry T. - **Spinocerebellar Ataxia Type I: Molecular Mechanisms of Neurodegeneration and Preclinical Studies.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, *Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology* v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 135–145.

ØSTERGAARD, Michael E. *et al.* - **Rational design of antisense oligonucleotides targeting single nucleotide polymorphisms for potent and allele selective suppression of mutant Huntingtin in the CNS.** *Nucleic Acids Research*. 41:21 (2013) 9634–9650. doi: 10.1093/nar/gkt725.

OYANAGI, Shinsaku - **Hereditary dentatorubral – pallidolusian atrophy.** *Neuropathology*. 20 (2002) 42–46. doi: 10.1046/j.1440-1789.2000.00307.x

PANDEY, Udai Bhan *et al.* - **HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS.** *Nature*. ISSN 14764687. 447:7146 (2007) 859–863.

PARBOOSINGH, J. S. *et al.* - **Spinobulbar muscular atrophy can mimic ALS: The importance of genetic testing in male patients with atypical ALS.** *Neurology*. . ISSN 00283878. 49:2 (1997) 568–572.

PARSONS, Matthew P.; RAYMOND, Lynn A. - **Huntington Disease.** In: ZIGMOND, M. J., ROWLAND L. P., COYLE, J. T., *Neurobiology of Brain Disorders: Biological Basis of Neurological and Psychiatric Disorders*. 1ª Ed ed. USA: Academic Press, 2015. ISBN 978-0-12-398270-4 p. 303–320.

PAULSON, H. L. *et al.* - **Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3.** *Neuron*. ISSN 08966273. 19:2 (1997) 333–344.

PFISTER, Edith L. *et al.* - **Five siRNAs Targeting Three SNPs May Provide Therapy for Three-Quarters of Huntington 's Disease Patients.** *Current Biology*. 19:9 (2009) 774–778. doi: 10.1016/j.cub.2009.03.030.

PIETROBON, Daniela - **Calcium channels and channelopathies of the central nervous system.** *Molecular Neurobiology*. ISSN 08937648. 25:1 (2002) 31–50.

PLATONOV, Fedor A. *et al.* - **Genetic fitness and selection intensity in a population affected with high-incidence spinocerebellar ataxia type I Fedor.** *Neurogenetics*. 17:3 (2016) 179–185. doi: 10.1007/s10048-016-0481-5

POLETTI, Angelo - **The polyglutamine tract of androgen receptor: From functions to dysfunctions in motor neurons.** *Frontiers in Neuroendocrinology*. ISSN 00913022. 25:1 (2004) 1–26.

PRINGSHEIM, Tamara *et al.* - **The incidence and prevalence of Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis.** *Movement Disorders*. ISSN 08853185. 27:9 (2012) 1083–1091.

PRUDENCIO, Mercedes *et al.* - **Toward allele-specific targeting therapy and pharmacodynamic marker for spinocerebellar ataxia type 3.** *Science Translational Medicine*. . ISSN 19466242. 12:566 (2020) 1–12.

PULST, Stefan M. *et al.* - **Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type.** *Nature Genetics.* . ISSN 10614036. 14:3 (1996) 269–276.

RANUM, Laura P. W. *et al.* - **Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type I: Evidence for familial effects on the age at onset.** *American Journal of Human Genetics.* ISSN 00029297. 55:2 (1994) 244–252.

RAWLINS, Michael D. *et al.* - **The prevalence of huntington's disease.** *Neuroepidemiology.* ISSN 14230208. 46:2 (2016) 144–153.

ROCKABRAND, Erica *et al.* - **The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis.** *Human Molecular Genetics.* ISSN 09646906. 16:1 (2007) 61–77.

RODRIGUEZ-LEBRON, E.; PAULSON, H. L. - **Allele-specific RNA interference for neurological disease.** *Gene therapy.* 13:6 (2006) 576–581. doi: 10.1038/sj.gt.3302702.

ROLFS, Arndt *et al.* - **Clinical features and neuropathology of autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA17).** *Annals of Neurology.* 54:3 (2003) 367–375. doi: 10.1002/ana.10676.

ROSS, Christopher A. *et al.* - **Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics.** *Nature Reviews Neurology.* ISSN 17594766. 10:4 (2014) 204–216.

ROSS, Christopher A. *et al.* - **Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics.** *Nature Reviews Neurology.* ISSN 17594766. 10:4 (2014) 204–216.

ROSS, Christopher A.; TABRIZI, Sarah J. - **Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment.** *The Lancet Neurology.* ISSN 1474-4422. 10:1 (2011) 83–98.

RÜB, U. *et al.* - **Guidelines for the pathoanatomical examination of the lower brain stem in ingestive and swallowing disorders and its application to a dysphagic spinocerebellar ataxia type 3 patient.** *Neuropathology and Applied Neurobiology.* ISSN 03051846. 29:1 (2003) 1–13.

RÜB, U. *et al.* - **Spinocerebellar Ataxia Type 7 (SCA7): First Report of a Systematic Neuropathological Study of the Brain of a Patient with a Very Short Expanded CAG-Repeat.** *Brain Pathology.* 15:4 (2005) 287–295.

RÜB, U. *et al.* - **Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): widespread brain damage in an adult-onset patient with progressive visual impairments in comparison with an adult-onset patient without visual impairments.** *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 34:2 (2008) 155–168. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00882.x.

RÜB, Udo *et al.* - **Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): Thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions.** *Brain Pathology.* ISSN 10156305. 16:3 (2006) 218–227.

RÜB, Udo *et al.* - **Consistent affection of the central somatosensory system in spinocerebellar ataxia type 2 and type 3 and its significance for clinical symptoms and rehabilitative therapy.** *Brain Research Reviews.* ISSN 01650173. 53:2 (2007) 235–249.

RUBINSZTEIN, D. C. *et al.* - **Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats.** *American Journal of Human Genetics.* ISSN 00029297. 59:1 (1996) 16–22.

RUZO, Albert *et al.* - **Discovery of novel isoforms of Huntingtin reveals a new hominid-specific exon.** PLoS ONE. ISSN 19326203. 10:5 (2015) 1–13.

SAHASHI, Kentaro *et al.* - **Silencing neuronal mutant androgen receptor in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy.** Human Molecular Genetics. ISSN 14602083. 24:21 (2015) 5985–5994.

SANDERS, Steven L. *et al.* - **Proteomics of the Eukaryotic Transcription Machinery: Identification of Proteins Associated with Components of Yeast TFIID by Multidimensional Mass Spectrometry.** Molecular and Cellular Biology. 22:13 (2002) 4723–4738. doi: 10.1128/MCB.22.13.4723.

SANPEI, K. *et al.* - **Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT.** Nature Genetics. ISSN 10614036. 14:3 (1996) 277–284.

SATTERFIELD, Terrence F.; PALLANCK, Leo J. - **Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes.** Human Molecular Genetics. ISSN 09646906. 15:16 (2006) 2523–2532.

SAUDOU, Frédéric; HUMBERT, Sandrine - **The Biology of Huntingtin.** Neuron. ISSN 10974199. 89:5 (2016) 910–926.

SCHEEL, Hartmut *et al.* - **Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics.** Human Molecular Genetics. 12:21 (2003) 2845–2852. doi: 10.1093/hmg/ddg297.

SCHMIDT, Thorsten *et al.* - **An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients.** Brain Pathology. ISSN 10156305. 8:4 (1998) 669–679.

SCHOLEFIELD, Janine *et al.* - **Design of RNAi hairpins for mutation-specific silencing of ataxin-7 and correction of a SCA7 phenotype.** PLoS ONE. ISSN 19326203. 4:9 (2009) 1–11.

SCHOLEFIELD, Janine *et al.* - **Allele-specific silencing of mutant Ataxin-7 in SCA7 patient-derived fibroblasts.** European journal of human genetics. ISSN 14765438. 22:12 (2014) 1369–1375.

SCHOLEFIELD, Janine; WOOD, Matthew J. A. - **Therapeutic gene silencing strategies for polyglutamine disorders.** Trends in Genetics. 26:1 (2009) 29–38. doi: 10.1016/j.tig.2009.11.005.

SCOLES, Daniel R. *et al.* - **ETSI regulates the expression of ATXN2.** Human Molecular Genetics. ISSN 09646906. 21:23 (2012) 5048–5065. doi: 10.1093/hmg/ddc349.

SCOLES, Daniel R.; PULST, Stefan M. - **Spinocerebellar Ataxia Type 2.** Em: NÓBREGA C., ALMEIDA, L. P. de, Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology v. 1049. Coimbra, Portugal: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-71778-4, p. 175–195.

SEIDEL, K. *et al.* - **Polyglutamine aggregation in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 3: similar mechanisms in aggregate formation.** Neuropathology and Applied Neurobiology. 42:2 (2016) 153–166. doi: 10.1111/nan.12253.

SEIDEL, Kay *et al.* - **Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3.** Acta Neuropathologica. 120:4 (2010) 449–460. doi: 10.1007/s00401-010-0717-7.

SEIDEL, Kay *et al.* - **Brain pathology of spinocerebellar ataxias.** Acta Neuropathologica. ISSN 00016322. 124:1 (2012) 1–21.

SHEPPARD, Kelly-Ann; MAYER, Jean; HUMAN, Usda - **HBPI: a HMG box transcriptional**

- repressor that is targeted by the retinoblastoma family.** *Genes and Development*. 11:3 (1997) 383–396. doi: 10.1101/gad.11.3.383.
- SHIMADA, Miho *et al.* - **Analysis of the chicken TBP-like protein(*tlp*) gene: evidence for a striking conservation of vertebrate TLPs and for a close relationship between vertebrate *tlp* and *tlp* genes.** *Nucleic Acids Research*. 27:15 (1999) 3146–3152. doi: 10.1093/nar/27.15.3146
- SHIN, Jun Wan *et al.* - **Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9.** *Human Molecular Genetics*. ISSN 14602083. 25:20 (2016) 4566–4576.
- SILVEIRA, I. *et al.* - **Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)*n* allele at the SCA17 locus.** *Archives of Neurology*. 59:4 (2002) 623–629. doi: 10.1001/archneur.59.4.623
- SIPILÄ, Jussi O. T. *et al.* - **Epidemiology of Huntington's disease in Finland.** *Parkinsonism and Related Disorders*. ISSN 18735126. 21:1 (2015) 46–49.
- SKINNER, Pamela J. *et al.* - **Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures.** *Nature*. ISSN 00280836. 389:6654 (1997) 971–974.
- SKOTTE, Niels H. *et al.* - **Allele-specific suppression of mutant huntingtin using antisense oligonucleotides: Providing a therapeutic option for all Huntington disease patients.** *PLoS ONE*. ISSN 19326203. 9:9 (2014) e107434
- SORARÙ, Gianni *et al.* - **Spinal and bulbar muscular atrophy: Skeletal muscle pathology in male patients and heterozygous females.** *Journal of the Neurological Sciences*. ISSN 0022510X. 264:1–2 (2008) 100–105.
- SOUTHWELL, Amber L. *et al.* - **A fully humanized transgenic mouse model of Huntington disease.** *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 22:1 (2013) 18–34.
- SOUTHWELL, Amber L. *et al.* - **In Vivo Evaluation of Candidate Allele-specific Mutant Huntingtin Gene Silencing Antisense Oligonucleotides.** *Molecular Therapy*. 22:12 (2014) 2093–2106. doi: 10.1038/mt.2014.153.
- SOUTHWELL, Amber L. *et al.* - **Huntingtin suppression restores cognitive function in a mouse model of Huntington's disease.** *Science Translational Medicine*. 10:461 (2018) 1–13. doi: 10.1126/scitranslmed.aar3959.
- SPADA, Albert R. La *et al.* - **Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy.** *Nature*. 352 (1991) 77–79. doi: <https://doi.org/10.1038/352077a0>.
- SPADA, Albert R La - **Spinal and bulbar muscular atrophy.** In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A: GeneReviews®. Seattle: University of Washington, 1996, atualizado em 26 Janeiro 2017. [Acedido a 10 agosto 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1333/>
- SPADA, Albert R La - **Spinocerebellar Ataxia Type 7.** In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A: GeneReviews®. Seattle: University of Washington, 1993, atualizado em 23 Julho 2020. [Acedido a 18 agosto 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1256/>
- STEVANIN, G. *et al.* - **Clinical and molecular features of spinocerebellar ataxia type 6.** *Neurology*. ISSN 00283878. 49:5 (1997) 1243–1246.

STEVANIN, G. *et al.* - **Multiple origins of the spinocerebellar ataxia 7 (SCA7) mutation revealed by linkage disequilibrium studies with closely flanking markers, including an intragenic polymorphism (G3145TG/A3145TG).** *European Journal of Human Genetics.* ISSN 10184813. 7:8 (1999) 889–896.

STEVANIN, Giovanni; BRICE, Alexis - **Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4).** *Cerebellum.* 7:2 (2008) 170–178. doi: 10.1007/s12311-008-0016-1

STOYAS, Colleen A.; SPADA, Albert R. La - **The CAG–polyglutamine repeat diseases: a clinical, molecular, genetic, and pathophysiological nosology.** Em: GESCHWIND, D. H., PAULSON, H. L., KLEIN, C., *Handbook of Clinical Neurology - Neurogenetics, Part I.* I. ed. [S.l.]: Elsevier, 2018. ISBN 9780444632333 p. 143–170.

SUENAGA, M. *et al.* - **Cognitive impairment in spinocerebellar ataxia type 6.** *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.* ISSN 00223050. 79:5 (2008) 496–499.

SULLIVAN, Roisin *et al.* - **Spinocerebellar ataxia: an update.** *Journal of Neurology.* ISSN 14321459. 266:2 (2019) 533–544. doi: 10.1007/s00415-018-9076-4

SUZUKI, Yasuyo; YAZAWA, Ikuru - **Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubral- pallidoluysian atrophy.** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 4:4 (2011) 378–384. PMID: 21577324

SUZUKI, Yasuyo; YAZAWA, Ikuru - **Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubralpallidoluysian atrophy.** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* ISSN 19362625. 4:4 (2011) 378–384.

TAKAHASHI, Hitoshi *et al.* - **Neuronal nuclear alterations in dentatorubral-pallidoluysian atrophy: ultrastructural and morphometric studies of the cerebellar granule cells.** *Brain Research.* 919:1 (2001) 12–19. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02986-9

TAKAHASHI, Toshiaki; KATADA, Shinichi; ONODERA, Osamu - **Polyglutamine diseases: Where does toxicity come from? What is toxicity? Where are we going?.** *Journal of Molecular Cell Biology.* ISSN 16742788. 2:4 (2010) 180–191.

TAN, Rachel H. *et al.* - **Cerebellar neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis cases with ATXN2 intermediate repeat expansions.** *Annals of Neurology.* ISSN 15318249. 79:2 (2016) 295–305.

TANAKA, Fumiaki *et al.* - **Founder effect in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA).** *Human Molecular Genetics.* ISSN 09646906. 5:9 (1996) 1253–1257.

TEJWANI, Leon; LIM, Janghoo - **Pathogenic mechanisms underlying spinocerebellar ataxia type 1.** *Cellular and Molecular Life Sciences.* ISSN 1420-9071. 0123456789 (2020).

TERASHIMA, Tomoya *et al.* - **SUMO-1 co-localized with mutant atrophin-1 with expanded polyglutamines accelerates intranuclear aggregation and cell death.** *NeuroReport.* 13:17 (2002) 2359–2364. doi: 10.1097/01.wnr.0000045009.30898.94

TORU, Shuta *et al.* - **Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function.** *Journal of Biological Chemistry.* ISSN 00219258. 275:15 (2000) 10893–10898.

TOYOSHIMA, Yasuko *et al.* - **Spinocerebellar Ataxia Type 17.** In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A: *GeneReviews®.* Seattle: University of Washington, 2005, atualizado em 12 setembro 2019. [Acedido a 20 agosto 2021]. Disponível na Internet: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1438/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1438/)

TSUJI, Shoji *et al.* - **Sporadic ataxias in Japan - A population-based epidemiological study**. *Cerebellum*. ISSN 14734222. 7:2 (2008) 189–197.

TSUJI, Shoji - **Dentatorubral-pallidoluysian atrophy**. Em: SUBRAMONY, S. H., DÜRR, A., *Handbook of Clinical Neurology- Ataxic Disorders*. 1. ed. [S.l.] : Elsevier B.V., 2012, ISBN 978-0-444-51892-7. p. 587–594.

UniProt: the universal protein knowledgebase - **UniProtKB - P54252 (ATX3\_HUMAN)** . S.l., actual.10 Abril 2018 [Consult. 4 Agosto 2021]. Disponível na Internet: <https://www.uniprot.org/uniprot/P54252#P54252-2>

VELÁZQUEZ-PÉREZ, Luis *et al.* - **Saccade velocity is controlled by polyglutamine size in spinocerebellar ataxia 2**. *Annals of Neurology*. ISSN 03645134. 56:3 (2004) 444–447.

VELÁZQUEZ-PÉREZ, Luis C.; RODRÍGUEZ-LABRADA, Roberto; FERNANDEZ-RUIZ, Juan - **Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinicogenetic Aspects , Mechanistic Insights , and Management Approaches**. *Frontiers in Neurology*. 8 (2017) 472. doi: 10.3389/fneur.2017.00472.

VENEZIANO, Liana *et al.* - **Newly characterised 5' and 3' regions of CACNA1A gene harbour mutations associated with Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia**. *Journal of the Neurological Sciences*. ISSN 0022510X. 276:1–2 (2009) 31–37.

VONSATTEL, Jean Paul *et al.* - **Neuropathological classification of huntington's disease**. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. ISSN 15546578. 44:6 (1985) 559–577.

WANG, Chaodong *et al.* - **Linkage analysis and whole-exome sequencing exclude extra mutations responsible for the parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia-2**. *Neurobiology of Aging*. ISSN 15581497. 36:1 (2015) 545.e1–545.e7.

WARBY, Simon C. *et al.* - **CAG Expansion in the Huntington Disease Gene Is Associated with a Specific and Targetable Predisposing Haplogroup**. *American Journal of Human Genetics*. ISSN 00029297. 84:3 (2009) 351–366.

WARNECKE, Tobias *et al.* - **Dysphagia in X-linked bulbospinal muscular atrophy (Kennedy disease)**. *Neuromuscular Disorders*. ISSN 09608966. 19:10 (2009) 704–708.

WARRENBURG, B. P. C. Van De *et al.* - **Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype**. *Journal of Neurology*. 248:10 (2001) 911–914. doi: 10.1007/s004150170082

WESTENBROEK, R. E. *et al.* - **Immunochemical identification and subcellular distribution of the  $\alpha$ (IA) subunits of brain calcium channels**. *Journal of Neuroscience*. ISSN 02706474. 15:10 (1995) 6403–6418.

WILLIAMS, Aislinn J.; PAULSON, Henry L. - **Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited**. *Trends in Neurosciences*. ISSN 01662236. 31:10 (2008) 521–528.

WOMACK, Mary D. *et al.* - **Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia**. *Nature Neuroscience*. 9:3 (2006) 389–397. doi: 10.1038/nn1648.

XIA, Jianrun *et al.* - **Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal**. *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 12:12 (2003) 1393–1403.

XU, Miao; WU, Zhi Ying - **Huntington disease in Asia**. *Chinese Medical Journal*. ISSN 03666999. 128:13 (2015) 1815–1819.

YAMADA, Mitsunori - **Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA): The 50th Anniversary of Japanese Society of Neuropathology.** Neuropathology. ISSN 09196544. 30:5 (2010) 453–457.

YANAGISAWA, Hiroko *et al.* - **A unique origin and multistep process for the generation of expanded DRPLA triplet repeats.** Human Molecular Genetics. ISSN 09646906. 5:3 (1996) 373–379.

YANG, Qing *et al.* - **Morphological Purkinje cell changes in spinocerebellar ataxia type 6.** Acta Neuropathologica. ISSN 00016322. 100:4 (2000) 371–376.

YAZAWA, Ikuru *et al.* - **Abnormal gene product identified in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) brain.** Nature Genetics. ISSN 15461718. 10:1 (1995) 99–103.

YOO, Seung-Yun *et al.* - **SCA7 Knockin Mice Model Human SCA7 and Reveal Gradual Accumulation of Mutant Ataxin-7 in Neurons and Abnormalities in Short-Term Plasticity.** Neuron. 37:3 (2003) 383–401.

YOUNG, Jessica E. *et al.* - **Proteolytic Cleavage of Ataxin-7 by Caspase-7 Modulates Cellular Toxicity and Transcriptional Dysregulation.** Journal of Biological Chemistry. ISSN 0021-9258. 282:41 (2007) 30150–30160.

YOUNGMAN, Sandra *et al.* - **Studies of a DNA marker (G8) genetically linked to Huntington disease in British families.** Human Genetics. ISSN 03406717. 73:4 (1986) 333–339.

YU, Fuli *et al.* - **Positive selection of a pre-expansion CAG repeat of the human SCA2 gene.** PLoS Genetics. ISSN 15537404. 1:3 (2005) 404–412.

YUE, Qing *et al.* - **Progressive ataxia due to a missense mutation in a calcium-channel gene.** American Journal of Human Genetics. ISSN 00029297. 61:5 (1997) 1078–1087.

YUE, Shinji *et al.* - **The spinocerebellar ataxia type I protein, ataxin-I, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract.** Human Molecular Genetics. ISSN 09646906. 10:1 (2001) 25–30.

ZHANG, Sheng *et al.* - **Drosophila Atrophin homolog functions as a transcriptional corepressor in multiple developmental processes.** Cell. ISSN 00928674. 108:1 (2002) 45–56.

ZHANG, Yu; ENGELMAN, Joshua; FRIEDLANDER, Robert - **Allele-specific silencing of mutant Huntington's disease gene.** Journal of Neurochemistry. 108:1 (2009) 82–90. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05734.x

ZHENG, Zhiqiang *et al.* - **An N-terminal nuclear export signal regulates trafficking and aggregation of huntingtin (Htt) protein exon I.** Journal of Biological Chemistry. ISSN 00219258. 288:9 (2013) 6063–6071.

ZHUCHENKO, O. *et al.* - **Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel.** Nature Genetics. 15 (1997) 57–61. doi: 10.1038/ng0197-62

ZOGHBI, Huda It; ORR, Harry T. - **Spinocerebellar ataxia type I.** Sminars in cell biology. 6 (1995) 24–35. doi: 10.1016/B978-0-12-374105-9.00198-2.

ZOGHBI, Huda Y.; ORR, Harry T. - **Glutamine Repeats and Neurodegeneration.** Annual Review of Neuroscience. ISSN 0147-006X. 23 (2000) 217–247.

ZUCCATO, Chiara; VALENZA, Marta; CATTANEO, Elena - **Molecular mechanisms and**

**potential therapeutical targets in Huntington's disease.** *Physiological Reviews.* 90:3 (2010) 905–981. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2009>.

ZÜHLKE, Christine *et al.* - **Spinocerebellar ataxia type I (SCA1): Phenotype-genotype correlation studies in intermediate alleles.** *European Journal of Human Genetics.* ISSN 10184813. 10:3 (2002) 204–209.