

DIFUSÃO DE GENES DELETÉRIOS: EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA E GENÉTICA POPULACIONAL

Lima, M.

Departamento de Biologia

Universidade dos Açores

Ponta Delgada

Certas doenças genéticas exibem uma representação anormalmente elevada em determinadas populações. Exemplos bem conhecidos de genes deletérios, ou seja, de genes prejudiciais, que implicam o aparecimento de patologias ou até mesmo que conduzem à morte, incluem a fibrose quística na população de canadenses franceses (Daigneault *et al.*, 1992), e o síndrome de Ellis-Van-Creveld, um tipo de nanismo associado à polidactilia, na população de Old Order Amish, um isolado cultural dos Estados Unidos (Mange & Mange, 1990).

Apesar dos mecanismos explicativos da elevada representação das patologias hereditárias terem sido investigados em alguns casos particulares, as causas da variação étnica para as doenças genéticas permanecem largamente desconhecidas. Com o avanço extremamente rápido da genética molecular criou-se uma confiança demasiado excessiva numa "solução tecnológica" para as doenças genéticas; como consequência, pouco progresso se tem feito em termos da investigação dos factores responsáveis pela distribuição destas últimas. Neste sentido, torna-se cada vez mais pertinente enquadrar o estudo das doenças genéticas numa matriz de factores biológicos, demográficos, sociológicos e até mesmo históricos.

Sempre que seja possível obter informação genealógica acerca das populações onde se observam frequências elevadas de doenças hereditárias, encontram-se reunidas as condições para, através da construção e posterior estudo dessas genealogias, se proceder à análise dos factores que controlam os padrões de distribuição dos genes mutantes. Vários autores têm publicado trabalhos desta natureza, tenho por "alvo" patologias muito distintas (Quadro 1). Dos exemplos constantes do Quadro 1 destaca-se a doença de Machado-Joseph.

A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma doença neurodegenerativa hereditária, transmitida de um modo autossómico dominante, de início tardio (média de 40 anos). Envolve vários sistemas neurológicos, sendo caracterizada essencialmente pela presença de ataxia (desequilíbrio da marcha) e pela limitação dos movimentos oculares (Coutinho, 1992). O gene responsável pela doença foi localizado no braço longo do cromossoma 14, por Takiyama e colaboradores, em 1993 (Takiyama *et al.*, 1993). Trata-se de uma mutação dinâmica, correspondendo a um gene que contém uma expansão instável do triplete CAG (Kawaguchi *et al.*, 1994). Os indivíduos não-portadores apresentam um número de repetições dentro de um conjunto de valores considerado normal, que oscila entre as 12 e as 37 repetições, ao passo que os indivíduos portadores apresentam valores muito superiores, que se situam entre as 66 e 84 repetições (Maciel *et al.*, 1995).

Quadro 1. Exemplos de patologias hereditárias estudadas numa perspectiva genealógica (AR-autossómica recessiva; AD-autossómica dominante).

Autores	Data	Doença	Transmissão	População
Bouchard <i>et al.</i>	1984	Tirosinemia	AR	Quebeque
Daigneault <i>et al.</i>	1992	Fibrose Quística	AR	Quebeque
Ikonen <i>et al.</i>	1992	Huntington	AD	Finlândia
Lima	1996	Machado-Joseph	AD	Açores

Descrita pela primeira vez em 1972 por Nakano, Dawson & Spence (Nakano *et al.*, 1972), em descendentes de emigrantes açorianos nos Estados Unidos da América, a doença foi, durante muito tempo considerada como uma "doença açoriana". Tal vínculo aos Açores e à ideia de uma doença étnica está bem expresso nas várias publicações científicas que apresentam a DMJ como uma "doença açoriana do sistema nervoso" (Romanul *et al.*, 1977; Goldberg-Stern *et al.*, 1994).

Apesar de presentemente esta patologia ser conhecida em muitos países, os Açores apresentam a maior concentração mundial de famílias afectadas (Lima *et al.*, 1997). A transmissão deste gene deletério em populações relativamente isoladas e de efectivo reduzido como as açorianas tem constituído uma oportunidade ideal para investigação em Epidemiologia Genética e Genética Populacional Humana (Lima, 1994; Lima, 1996; Lima, 1996b).

Podem considerar-se como subjacentes aos estudos em Epidemiologia Genética e Genética Populacional de doenças hereditárias três questões principais, das quais apenas as duas primeiras serão desenvolvidas neste trabalho:

- 1) Como se representam e distribuem as doenças em estudo nas respectivas populações?
- 2) Qual a origem de determinada doença, numa população? (por exemplo, terá ocorrido uma única introdução do gene mutante, ou pelo contrário, terão existido várias introduções); de que modo tal origem está de acordo com a representação observada?
- 3) Quais os factores (biológicos, biodemográficos, sociológicos e históricos) que mais directamente condicionam a dispersão dos genes deletérios, nas populações em causa?

A fase inicial do trabalho em Epidemiologia Genética recorre necessariamente a uma identificação dos casos, designada geralmente como "rastreo". Nesta etapa, o trabalho deve ser feito em conjunto pelas equipas médicas, pelo epidemiologista e pelos geneticistas clínicos e laboratoriais (no caso de uma doença cuja mutação seja conhecida). A eficácia desta fase assenta na capacidade de isolar os casos para estudo, ou seja, na possibilidade de se efectuar um diagnóstico diferencial, o que raramente é tarefa fácil. Tal dificuldade pode ser melhor compreendida tomando como exemplo a DMJ: anteriormente à identificação do gene, que ocorreu apenas em 1994 (Kawaguchi *et al.*, 1994), o reconhecimento da doença apenas podia assentar no exame neurológico dos doentes (diagnóstico clínico). Sendo a DMJ uma doença pleomórfica, com uma complexa combinação de sinais clínicos, o seu diagnóstico pode revelar-se assaz difícil. A complexidade clínica implícita na DMJ está expressa na descrição de três tipos clínicos, que correspondem a diferentes associações de sintomas e aos quais se fazem corresponder idades de início distintas (Lima & Coutinho, 1980).

Com base em critérios clínicos a situação da DMJ nos Açores, utilizando como indicador o número de famílias afectadas, consta do Quadro 2. Contabilizava-se um total de 34 famílias, distribuídas originalmente pelas ilha de S. Miguel, Terceira, Graciosa e Flores (Lima *et al.*, 1997).

Quadro 2. Número de famílias portadoras da DMJ nos Açores; (1-Valores de 1996, baseados em dados clínicos; 2-Valores de 1997, integrando os dados moleculares disponíveis no fim de 1997).

Ilha	Número de famílias (1)	Número de famílias (2)
S. Miguel	12	10
Terceira	1	1
Graciosa	1	1
Flores	20	20
Total	34	32

Em termos teóricos, o diagnóstico molecular permite a confirmação de que os doentes identificados previamente por diagnóstico clínico, possuem a mutação da DMJ (a expansão CAG no espectro patológico). Assim, pelo menos um doente em cada família afectada deve ser testado para a presença/ausência da expansão. Apesar de longe de terminada, (apenas estão confirmadas 50% das famílias) a análise molecular conduziu já à modificação dos valores referentes ao número de famílias, como é visível no Quadro 2.

É exigido pois ao Epidemiologista Genético um trabalho contínuo de actualização de dados e de integração dos resultados obtidos pelos novos utensílios de Genética Molecular. Trata-se de um problema geral no estudo de doenças hereditárias: apenas com a correcta caracterização dos casos e dispondo de conhecimentos de base acerca das famílias afectadas se pode chegar à formulação de hipóteses adequadas sobre os mecanismos que permitem a manutenção dos genes deletérios nas populações.

Após a fase inicial de reconhecimento dos casos, é necessário recorrer a algum tipo de "medida de representação" da patologia, na população em causa. As taxas de prevalência e de incidência constituem medidas frequentemente utilizadas neste contexto, por serem relativamente simples de aplicar e traduzirem, de um modo claro, a representação populacional das doenças. Por prevalência entende-se o número de indivíduos pertencentes a uma dada população que, num dado momento, apresentam determinada patologia. A incidência é muitas vezes utilizada erradamente como sinónimo de prevalência, mas traduz a probabilidade de que indivíduos saudáveis, pertencentes ao grupo de risco, expressem a doença, num período de tempo específico (Mausner &

Kramer, 1990). Prevalência e incidência distinguem-se pela realidade que traduzem: a prevalência é útil para calcular o "fardo" que representa determinada doença. No entanto, apenas a incidência lida directamente com a noção de risco. Na prática, o cálculo da incidência é mais complexo do que o da prevalência, essencialmente por duas razões: em primeiro lugar por assentar na definição de "população em risco"; em segundo, por exigir a identificação rigorosa dos novos casos de doença (o que deveria envolver o seguimento regular dos indivíduos ditos "em risco").

No caso de uma patologia autossómica dominante (com uma probabilidade de transmissão de 50%), consideram-se como estando "em risco" os indivíduos constantes da descendência imediata de um doente (filho ou filha, portanto). Relativamente à DMJ e tratando-se de uma doença de manifestação tardia (com início na idade adulta) torna-se impossível determinar a partir de que idade um filho de um doente DMJ deixa de estar em risco. Na ausência de um diagnóstico molecular praticamente estará nessa situação durante toda a vida. A aplicação da noção de prevalência à DMJ, conduz aos valores que se observam no Quadro 3 (para uma análise detalhada dos valores de prevalência nos Açores e das suas implicações ver Lima *et al.*, 1997).

Uma terceira fase da caracterização epidemiológica poderá corresponder à análise da distribuição geográfica dos casos. Esta análise visa fundamentalmente avaliar até que ponto a distribuição dos doentes surge como consequência da distribuição da população geral ou se, pelo contrário, os casos estão distribuídos por zonas específicas, organizando-se por focos. Este aspecto é crucial, pois pode ser facilmente relacionável com os mecanismos de génética populacional na base da dispersão do gene da doença.

Quadro 3. Valores de prevalência da DMJ nos Açores (Lima *et al.*, 1997).

Ilha	Prevalência
S. Miguel	1/3148
Terceira	1/6190
Graciosa	1/865
Flores	1/106
Açores	1/2402

Na Figura 1 é visível a distribuição geográfica da naturalidade dos doentes de DMJ na ilha de S. Miguel.

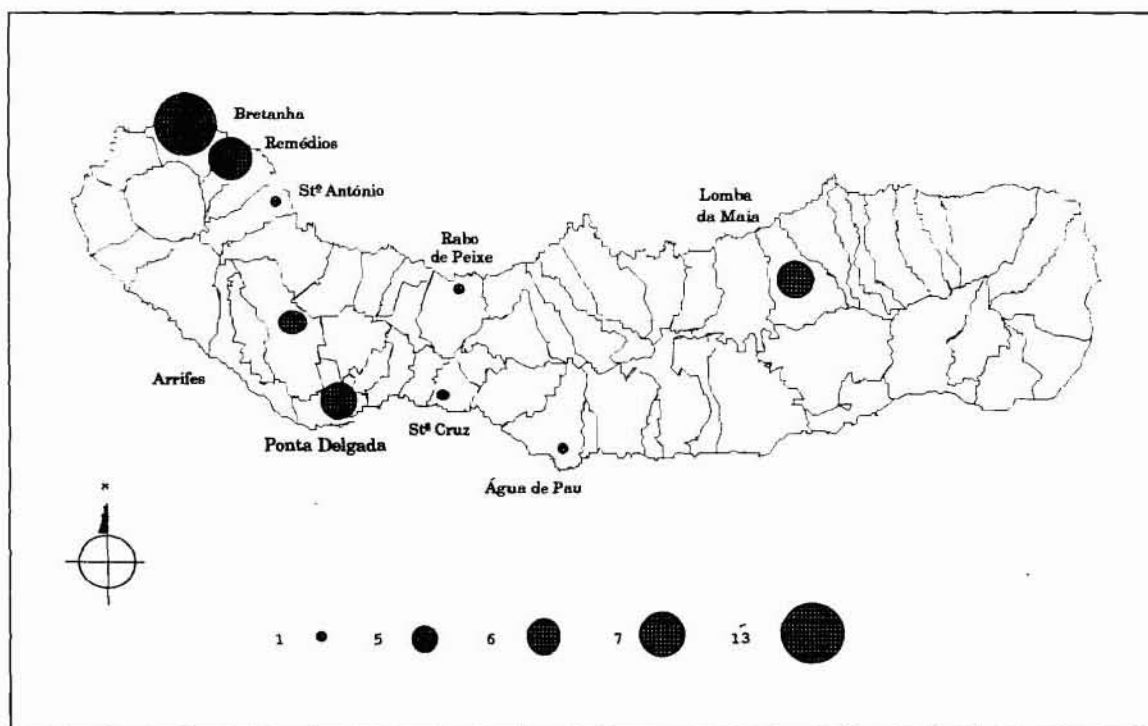


Figura 1. Distribuição geográfica da naturalidade dos doentes na ilha de São Miguel (Lima *et al.*, 1997).

Verifica-se que existe uma concentração de doentes em zonas específicas da ilha. Também no caso da ilha das Flores (Figura 2), a distribuição dos doentes se faz por focos. Em ambos os casos ficou estatisticamente demonstrado que a distribuição dos doentes era independente da distribuição do efectivo populacional (Lima, 1996). Tal exige a presença de mecanismos específicos subjacentes a esta distribuição, alguns dos quais relacionáveis com a origem da própria mutação.

O estudo da origem das mutações na base das doenças genéticas constitui uma área de investigação que recentemente tem sido designada de "Genética Histórica". A investigação em Genética Histórica pode ser feita essencialmente a partir de dois tipos de dados:

1. Moleculares
2. Genealógicos

No primeiro caso recorre-se à análise do DNA com o objectivo de tentar inferir acerca da origem das mutações. Por exemplo, pode tentar determinar-se se a mutação em causa corresponde a um acidente genético único ou se, pelo contrário, teve uma origem repetida, correspondendo a diversos eventos mutacionais.

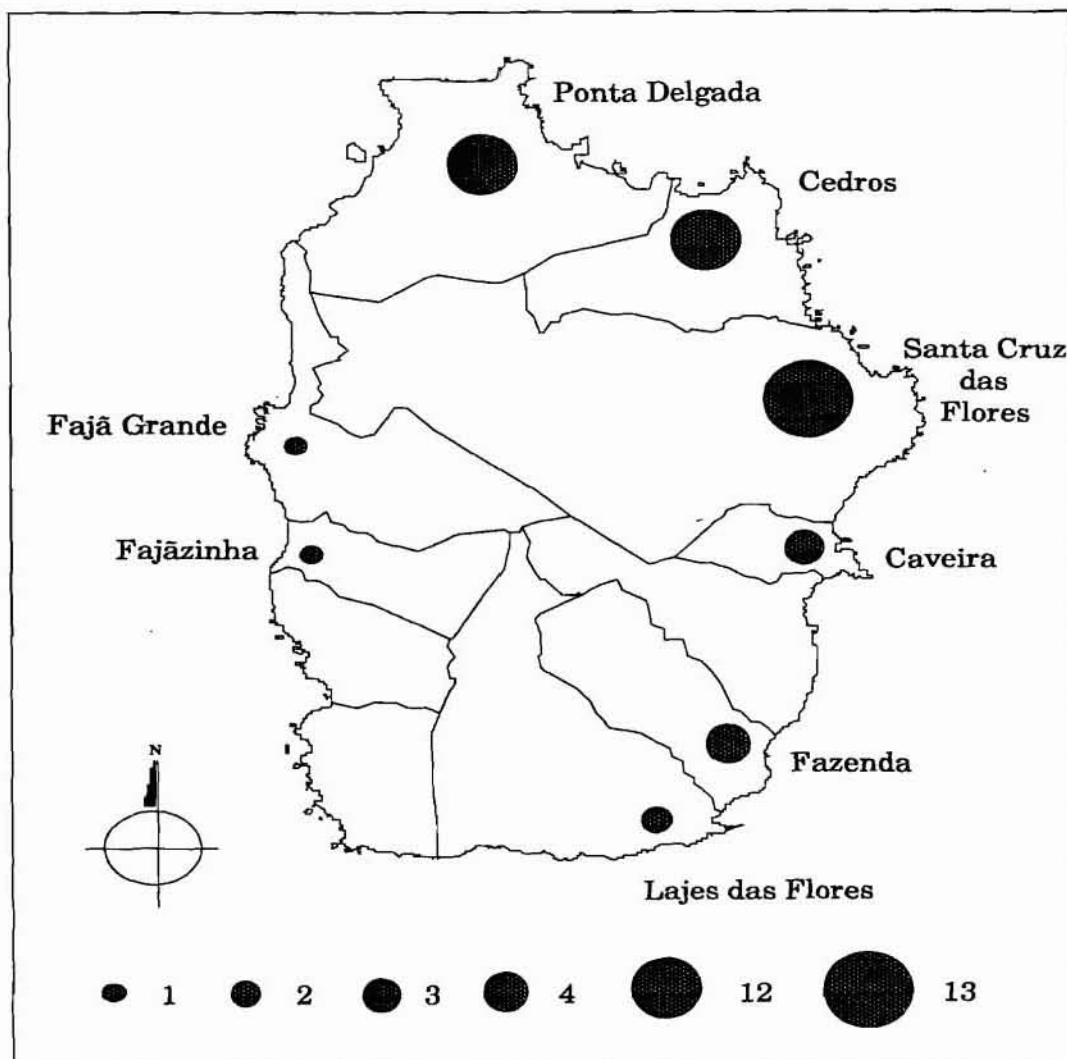


Figura 2. Distribuição geográfica da naturalidade dos doentes na ilha das Flores (Lima *et al.*, 1997).

Segundo esta metodologia, o número de haplótipos associados a um dado gene mutante pode fornecer informação acerca do número de indivíduos que originalmente o terão introduzido numa dada população. Por haplótipo entende-se uma associação de alelos diferentes, mas próximos, num mesmo cromossoma (Kaplan & Delpech, 1993). Em termos gerais pode-se dizer que sempre que vários haplótipos sejam definidos para uma dada mutação, podemos inferir que a patologia resultante tem uma origem multicêntrica.

Quando existir apenas um haplótipo em todos os doentes tal indicia que todos estes o herdaram de um antepassado comum único (para uma abordagem mais detalhada acerca da utilização dos haplótipos no estudo da origem das mutações ver Kaplan & Delpech, 1993).

O segundo método de investigação em Genética Histórica recorre a um material de base radicalmente diferente do utilizado em Biologia Molecular, tendo, contudo, objectivos sobreponíveis. Tal material é constituído pelas genealogias, cujos dados se retiram de fontes tradicionalmente assumidas como subjacentes à investigação na área da História: os registos paroquiais e civis. Tal facto não retira aos estudos de Genética Populacional, baseados nas genealogias, o seu carácter próprio: pelo contrário, reforça-o, uma vez que as genealogias são, para os seres humanos, o único modo de estudar, não apenas o resultado final da transmissão dos genes, mas sim de analisar com grande detalhe todo o percurso de um gene numa população, ao longo de várias gerações. Assim, e se bem que o advento da Biologia Molecular tenha permitido dar resposta a várias questões relacionadas com a origem e dispersão de genes deletérios, tal não implicou o abandono da investigação genealógica, que continua a revelar-se crucial no estudo de doenças hereditárias.

Dois tipos de genealogias servem de suporte aos estudos em genética populacional humana, as genealogias descendentes e as ascendentes. São estas últimas que permitem analisar os aspectos relacionados com a origem das mutações. Em termos metodológicos, as ascendências exigem a identificação dos ancestrais de determinado indivíduo, mas não dos seus colaterais, como acontece nas descendências. Recuam tanto quanto possível no tempo e os seus limites são impostos pelas próprias limitações das fontes. Genealogias ascendentes e descendentes têm características diferentes, sendo construídas para analisar aspectos distintos do estudo de uma patologia. Às ascendências obtidas após o trabalho de reconstrução podem aplicar-se as chamadas "medidas de informação genealógica". Estas medidas permitem avaliar o número de dos ancestrais nas genealogias e a sua distribuição. Este é um passo importante, pois as conclusões a retirar de qualquer estudo com base nas genealogias devem estar devidamente fundamentadas pela solidez dos dados nelas contidos (para uma descrição detalhada das metodologias subjacentes à análise genealógica ver Lima, 1996).

Numa genealogia ascendente os indivíduos nos quais a informação genealógica cessa são designados de "fundadores". Estes "fundadores genealógicos" não coincidem necessariamente com os fundadores efectivos da população, sendo representados pelos indivíduos nos topos das ascendências nos quais a informação genealógica cessa, ou seja, cuja filiação é desconhecida. Nas ascendências das famílias DMJ açorianas os fundadores representam indivíduos cuja data mais recuada de casamento se situa em meados do século XVI (1545). A identificação dos fundadores das ascendências dos doentes DMJ permitiu efectuar uma série de análises extremamente interessantes, sob o ponto de vista de genética populacional. Foi possível, por exemplo, comparar a distribuição geográfica dos doentes actuais e dos fundadores das genealogias, com vista a determinar a presença histórica de núcleos geográficos para a doença. Esta análise para a DMJ, na ilha de S. Miguel, permitiu a definição de 3 situações distintas (Figura 3)

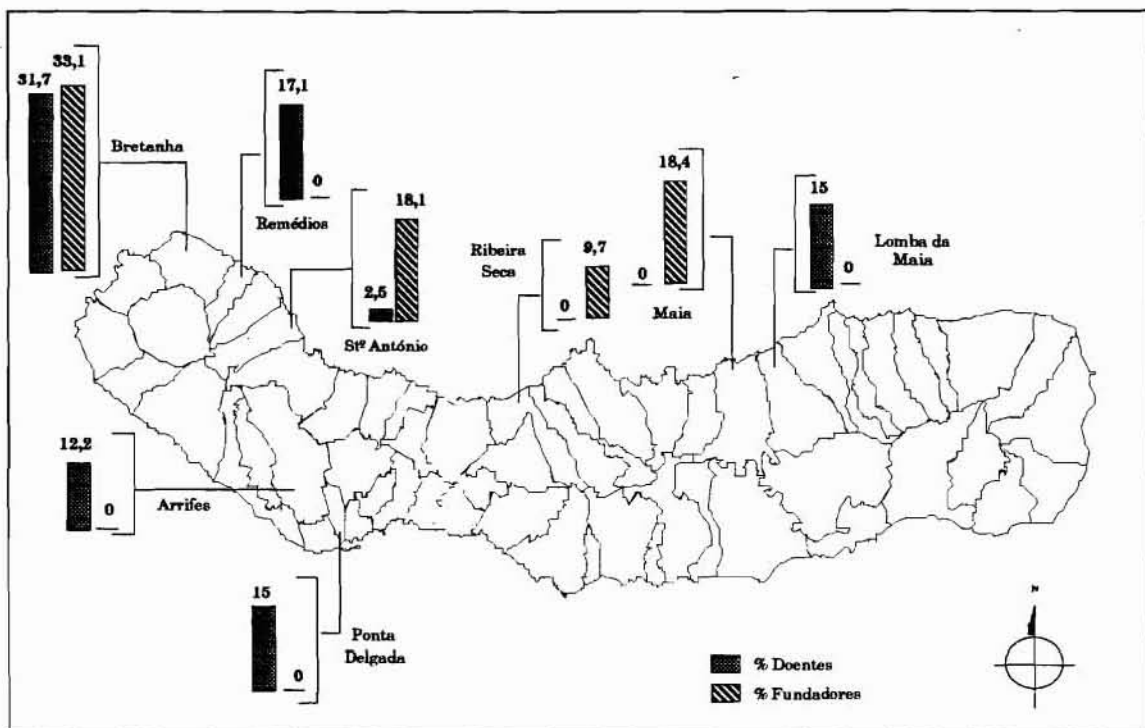


Figura 3. Frequências, por local de origem, de doentes e fundadores em São Miguel (Lima *et al.*, 1997).

Assim observam-se:

- a) Populações com percentagens elevadas quer de doentes quer de fundadores (p.ex. a freguesia da Bretanha);

b) Populações com elevados valores para doentes e baixos para fundadores (Ponta Delgada, Arrifes e Lomba da Maia);

c) Populações com percentagens elevadas para os fundadores e baixas para os doentes (por exemplo, Santo António).

Idênticas situações podem ser definidas relativamente às famílias das Flores (Figura 4) com Santa Cruz e Ponta Delgada apresentando valores elevados de doentes e de fundadores. As populações que apresentam uma concentração elevada quer de doentes quer de fundadores definem sítios cruciais para a origem da doença (Lima *et al.*, 1997).

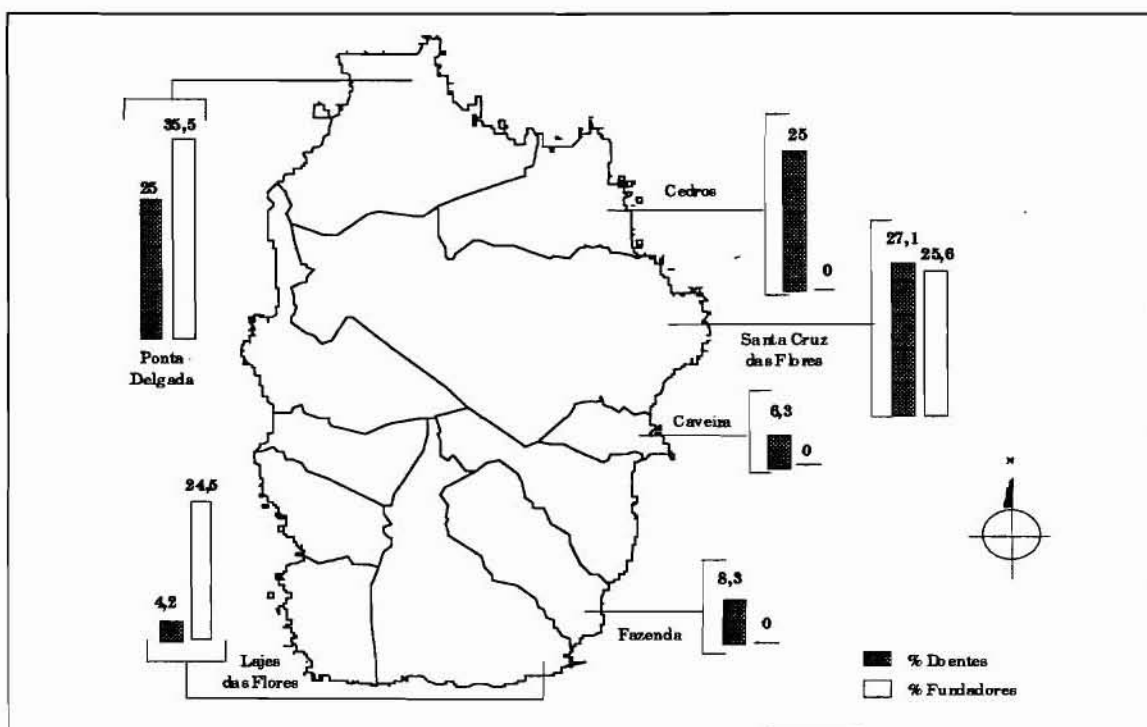


Figura 4. Frequências, por local de origem, de doentes e fundadores nas Flores (Lima *et al.*, 1997).

Ao dispor-se de ascendências para as famílias com doenças genéticas pode-se tentar inferir acerca da presença de elos entre os ancestrais dessas mesmas famílias. Para tal, várias medidas de relação genética podem ser utilizadas, tais como o coeficiente de consanguinidade e de parentesco (Jacquard, 1970). Em termos genéricos pode dizer-se que ambas permitem detectar ancestrais comuns e quantificar a relação genética entre os proponentes das genealogias. Assim, estes coeficientes dão-nos indicações acerca da origem dos próprios genes deletérios. Quando todos os indivíduos portadores de uma

determinada doença genética estão relacionados por elos de parentesco e, portanto, partilham um ancestral comum, fala-se geralmente de "efeito fundador"; a capacidade de demonstrar a presença do efeito fundador depende, obviamente, da capacidade de recuar suficientemente no tempo as ascendências.

Os elos encontrados entre as várias famílias DMJ açorianas estão ilustrados na Figura 5. Os mais recentes ocorrem em meados do século XIX (1854); os elos mais precoces estabelecem-se em meados do século XVII (1655). A maioria das famílias (64,7%) tem pelo menos um elo com outra família DMJ. Contudo, para 12 famílias não foi encontrado nenhum elo genealógico. Das famílias DMJ com elos detectados destaca-se a da Terceira, que se liga a 3 famílias DMJ das Flores. Conclui-se portanto que a mutação presente na família da Terceira teve a sua origem nas Flores.

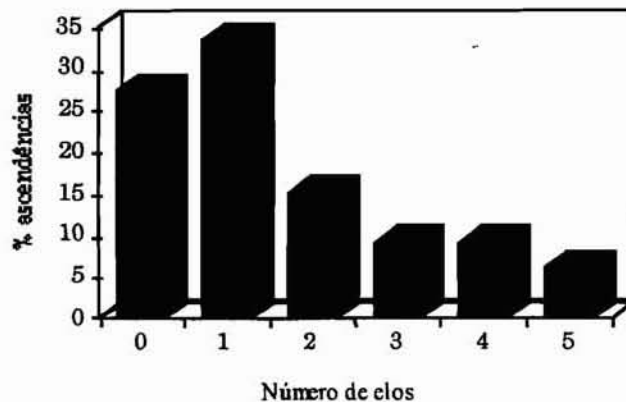


Figura 5. Elos entre as várias famílias DMJ açorianas (Lima *et al.*, 1997).

A investigação que tem vindo a ser conduzida, de reconstrução e de análise genética das ascendências DMJ permitiu chegar a resultados que apontam para (Lima *et al.*, 1998):

- 1) Ausência de ligações entre as famílias afectadas de São Miguel e das Flores.
- 2) Presença de dois conjuntos de fundadores, um para S. Miguel e o outro para as Flores/Terceira.

Estes resultados foram confrontados com os até ao momento obtidos nos estudos moleculares. Dois haplótipos diferentes estarão presentes nos doentes DMJ açorianos (Gaspar *et al.*, 1996): um nos de S. Miguel e o outro nos das Flores. A explicação mais provável para a presença desses dois haplótipos nos Açores é a de que terão existido duas introduções distintas da doença. Assim, os dados moleculares confirmaram o rigor dos resultados obtidos previamente com base nas genealogias.

O modelo construído relativamente à origem da DMJ nos Açores está representado na Figura 6 (Lima *et al.*, 1998). De acordo com o mesmo ocorreram pelo menos duas introduções do gene da DMJ, correspondentes a eventos mutacionais diferentes (aos quais estão associados 2 haplótipos diferentes). Estas introduções terão sido feitas provavelmente por portugueses, antes do século XVII. A mutação presente na família da Terceira originou-se nas Flores. A tipagem molecular da família terceirense está a ser efectuada, de modo a confirmar se o haplótipo presente nesta última é idêntico ao encontrado nas famílias florentinas. Apesar da origem da família da Graciosa não ter sido esclarecida por via genealógica, dada a impossibilidade de reconstrução, sabe-se que o haplótipo presente é idêntico ao das famílias DMJ de S. Miguel (Gaspar *et al.*, 1996).

A antiguidade dos elos estabelecidos entre as famílias DMJ nega, obviamente, à doença a designação de "Açoriana". Trata-se de uma mutação introduzida, e não ocorrida nos Açores. A análise das famílias DMJ continentais (nas quais ambos os haplótipos estão igualmente presentes), está a ser efectuada, quer sob o ponto de vista genealógico, quer molecular. Tal análise trará, sem dúvida, novos dados relativos à origem desta doença.

Para concluir poder-se-á dizer que a caracterização epidemiológica de uma doença genética e a análise dos aspectos referidos anteriormente não esgotam a investigação possível; muito pelo contrário, lançam as bases de trabalho para a compreensão dos restantes mecanismos de genética de populações potencialmente envolvidos. Sabe-se que, uma vez uma mutação presente numa dada população o seu destino depende do comportamento dos portadores: a possibilidade dos mesmos se reproduzirem, o número de filhos que terão, o número dos mesmos que sobreviverão até à idade adulta, o número dos que irão emigrar, são factores determinantes. Podemos pois afirmar que "o destino genético é cego; são os comportamentos dos indivíduos que o guiam" (Bouchard, 1991).

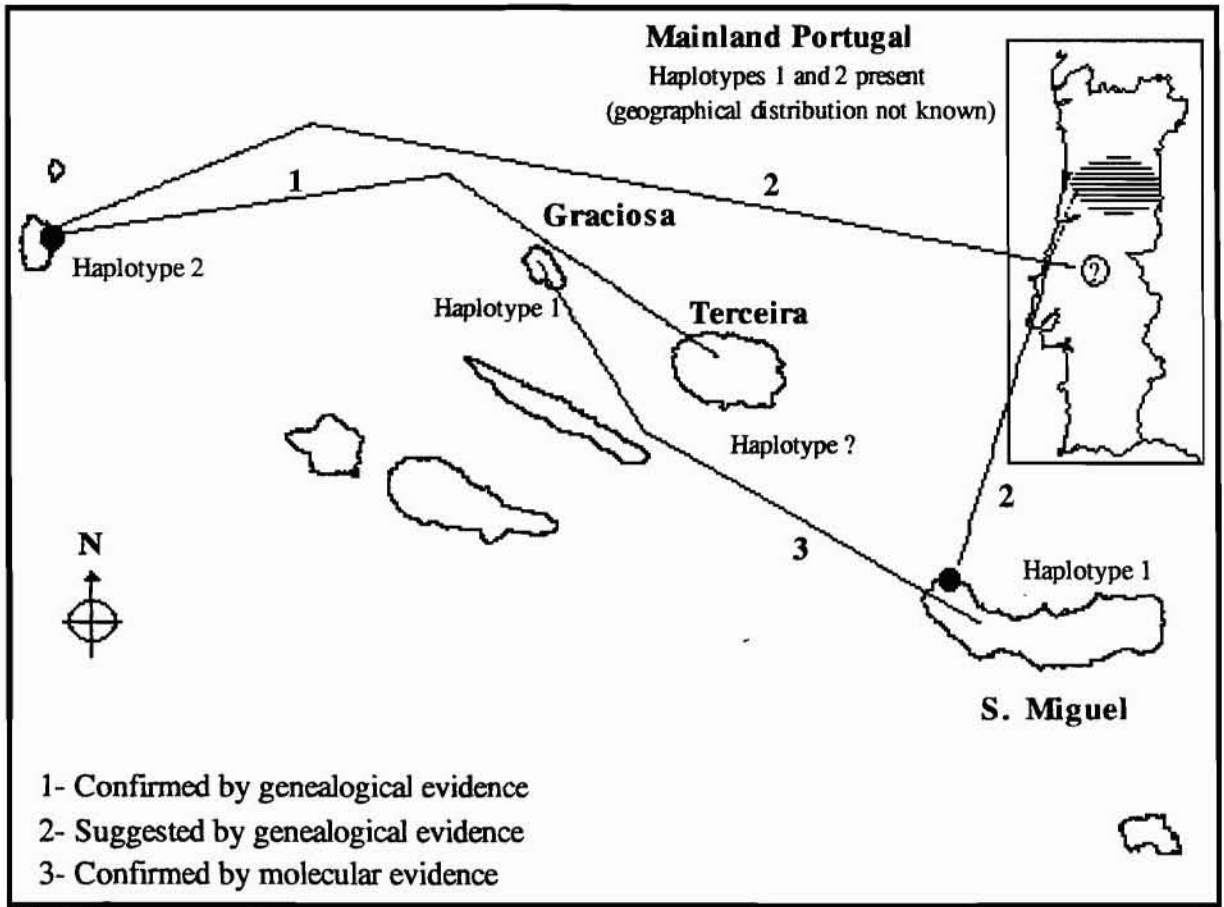


Figura 6. Modelo para a origem da DMJ nos Açores (Lima *et al.*, 1998).

Bibliografia

- Bouchard, G., C. Laberge, C. R. Scriver, F. Glorieux, M. Declos, L. Bergeron, J. Larochelle & S. Mortezaei, 1984. Étude démographique et généalogique de deux maladies héréditaires au Saguenay. *Cahiers Québécois de Démographie*, 13(1): 118-137.
- Bouchard, G., 1991. Reproduction familiale et "effets multiplicateurs". In: Bouchard, G., & M. DeBraekeleer (Ed.), *Histoire d'un génôme*, pp.215-252. Presses de L'Université du Québec, Québec.
- Coutinho, P., 1992. *Doença de Machado-Joseph - Tentativa de definição*, 247 pp. Dissertação de Doutoramento, Universidade do Porto, Porto.
- Daigneault, J., G. Aubin, F. Simard & M. DeBraekeleer, 1992. Incidence of cystic fibrosis in Saguenay-Lac-St. Jean (Quebec, Canada). *Human Biology*, 64(1): 115-119.
- Gaspar, C., I. Lopes-Cendes, A. L. DeStefano, P. Maciel, I. Silveira, P. Coutinho, P. MacLeod, J. Sequeiros, L. A. Farrer & G. Rouleau, 1996. Linkage disequilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of different ethnic origins. *Hum Genet* 98:620-624.
- Goldberg-Stern, H., R. D'Jaldetti, E. Melamed & N. Gadoth, 1994. Machado-Joseph (Azorean) disease in a Yemenite Jewish family in Israel. *Neurology*, 44: 1298-1301.
- Ikonen E., J. Ignatius, R. Norio, J. Palo & L. Peltonen, 1992. Huntington disease in Finland: a molecular and genetic study. *Human Genetics*, 89: 275-280.
- Jacquard, A., 1970. *Structures génétiques des populations*, 399 pp. Masson et Cie, Paris.
- Kaplan, J. C. & M. Delpech, 1993. *Biologie Moléculaire et Médecine*, 2^a Ed., 790 pp. Flammarion Médecine-Sciences, Paris

- Kawaguchi, Y., T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akigushi, J. Kimura, S. Narumiya & A. Kakizuka, 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics*, 8: 221-228.
- Lima, L., & P. Coutinho, 1980. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: Report of a non-Azorean portuguese family. *Neurology*, 30: 319-322.
- Lima, M., 1994. Founder effect in Machado-Joseph disease on the island of São Miguel (Azores, Portugal). *The American Journal of Human Genetics*, 55(3): 335 [Abst.].
- Lima, M., 1996. Demografia e genética histórica na doença de Machado-Joseph. In: Sequeiros, J. (Ed.), *O teste preditivo da doença de Machado-Joseph*, pp. 27-32. UnIGENE, Porto.
- Lima, M., 1996b. *Doença de Machado-Joseph nos Açores: Estudo epidemiológico, biodemográfico e genético*, 299 pp. Dissertação de Doutoramento, Universidade dos Açores.
- Lima, M., F. Mayer, P. Coutinho & A. Abade, 1997. Prevalence, geographical distribution and genealogical investigation of Machado-Joseph disease in the islands of the Azores (Portugal). *Human Biology*, 69(3): 383-391.
- Lima, M., F. M. Mayer, P. Coutinho & A. Abade, 1998. Origins of a Mutation: Populations Genetics of Machado-Joseph Disease in the Azores (Portugal). *Human Biology*, 70(6): 1011-1023.
- Maciel, P., C. Gaspar, I. Silveira, P. Coutinho, J. L. Loureiro, J. Guimarães, G. Rouleau & J. Sequeiros, 1995. Machado-Joseph disease: CAG repeat length and clinical features. *Journal of Neurology*, 242 (Supl. 6): S32.
- Mange, A. P. & E. J. Mange, 1990. *Genetics: Human Aspects*, 2^a ed., 591pp. Sinauer Associates, Inc, Massachusetts.

- Mausner, J. S., & S. Kramer, 1990. *Introdução à Epidemiologia*, 543 pp. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Nakano, K., D. M. Dawson & A. Spence, 1972. Machado disease - A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22: 49-55.
- Romanul, F. C. A., H. L. Fowler, J. Radvany, R. J. Feldman & M. Feingold, 1977. Azorean disease of the nervous system. *The New England Journal of Medicine*, 296: 1505-1508.
- Takiyama, Y., M. Nishizawa, H. Tanaka, S. Kawashima, H. Sakamoto, Y. Karube, H. Shimazaki, M. Soutome, K. Endo, S. Ohta, Y. Kagawa, I. Kanazawa, Y. Mizuno, M. Yoshida, T. Yuasa, Y. Horikawa, K. Oyanagi, H. Nagai, T. Kondo, T. Inuzuka, O. Onodera & S. Tsuji, 1993. The Gene for Machado-Joseph Disease Maps to Human Chromosome 14q. *Nature Genetics*, 4(3): 300-304.