



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FABRICIO CASTRO DE BORBA

DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS AO GENE ATXN2:
CARACTERIZAÇÃO DO ESPECTRO CLÍNICO E DE NEUROIMAGEM ESTRUTURAL

CAMPINAS

2025

FABRICIO CASTRO DE BORBA

DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS AO GENE *ATXN2*:
CARACTERIZAÇÃO DO ESPECTRO CLÍNICO E DE NEUROIMAGEM
ESTRUTURAL

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO FABRICIO CASTRO DE BORBA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR.

CAMPINAS

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8402

B644d Borba, Fabrício Castro de, 1991-
Doenças neurodegenerativas associadas ao gene ATXN2 : caracterização do espectro clínico e de neuroimagem estrutural / Fabrício Castro de Borba. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Marcondes Cavalcante França Junior.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ataxia espinocerebelar tipo 2. 2. Esclerose lateral amiotrófica. 3. Ataxina-2. 4. Neuroimagem. 5. Doenças da medula espinal. 6. Imageamento por ressonância magnética. 7. Biomarcadores. I. França Junior, Marcondes Cavalcante, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: ATXN2-related neurodegenerative diseases : characterization of the clinical and structural neuroimaging spectrum

Palavras-chave em inglês:

Spinocerebellar ataxia type 2
Amyotrophic lateral sclerosis
Ataxin-2
Neuroimaging
Spinal cord diseases
Magnetic resonance imaging
Biomarkers

Área de concentração:

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marcondes Cavalcante França Junior [Orientador]
Anamarli Nucci
Pedro Braga Neto
Leonardo Cruz de Souza
Fábio Rogério

Data de defesa: 11-07-2025

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 3. Saúde e bem-estar

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6846-4037>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2922464819641033>

MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

ANAMARLI NUCCI

PEDRO BRAGA NETO

LEONARDO CRUZ DE SOUZA

FÁBIO ROGERIO

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Felipe e Antônia e à minha esposa, Bruna, sem os quais não estaria aqui.

PÁGINA DE AGRADECIMENTOS

A conclusão de uma tese de doutorado é resultado do esforço coletivo e da contribuição de diversas pessoas. Ao longo desta jornada, tive o privilégio de contar com o apoio de muitas delas, que não apenas colaboraram, mas também me ensinaram lições valiosas. Por isso, expresso aqui minha profunda gratidão.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica, desde os primeiros anos de estudo até o meu orientador de doutorado, professor Marcondes, que me abre portas no meio acadêmico desde o primeiro ano da residência médica e precisou de muita paciência para me orientar depois de dois TCCs e uma tese de doutorado.

Dentre tantos, não posso deixar de mencionar os professores Milton Marchioli, Ana Paula Ceolotto Guimarães do Amaral e Luis Gustavo Baaklini que abriram portas para minhas primeiras contribuições científicas ainda na faculdade, além de outros mestres que alimentaram minha fascinação pela neurologia, em especial os professores Alberto Costa e Anamarli Nucci.

Cada um deles contribuiu de maneira única para minha formação intelectual e pessoal. Também agradeço aqueles mestres que viram em mim um potencial e me permitiram crescer com as minhas particularidades, não esperando que me encaixasse em seus próprios modelos de um profissional ideal.

Minha gratidão também se estende aos grandes pensadores do passado, cujas obras e ideias, transmitidas através de livros e artigos, transcenderam e influenciaram profundamente meu pensamento crítico e científico.

À equipe multiprofissional do Hospital de Clínicas da UNICAMP que auxiliou na coleta e análise dos dados, pela dedicação e comprometimento.

Agradeço aos pacientes e seus familiares, que, apesar das limitações impostas pela doença, participaram desta pesquisa com generosidade e um espírito altruísta, ajudando a promover o avanço científico.

Aos amigos e colegas de profissão, que compartilharam conhecimento, desafios e conquistas, tornando o caminho mais enriquecedor e leve, em especial meus colegas e amigos da residência médica em neurofisiologia clínica, Mariana e Renan.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui meu sincero agradecimento.

RESUMO

A ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2) e a esclerose lateral amiotrófica (ELA) são doenças neurodegenerativas sem cura. Ambas se associam, pois uma mutação do tipo expansão no gene *ATXN2* pode causar SCA2 (>34 repetições) ou aumentar o risco para ELA (27-34 repetições), também denominada “ELA associada ao gene *ATXN2*” (ELA-*ATXN2*). Há lacunas de conhecimento sobre a intersecção anatômica dessas doenças e as relações fisiopatológicas entre a ELA, ELA-*ATXN2* e SCA2 ou mesmo entre SCA2 e outras doenças do espectro das ataxias espinocerebelares como a SCA3 e SCA6. Esta tese teve como objetivo caracterizar, sob uma perspectiva clínica e de neuroimagem estrutural utilizando sequências avançadas de ressonância magnética, pacientes com SCA2, SCA3, SCA6, ELA e ELA-*ATXN2*, explorando diferenças fenotípicas, padrões de imagem e correlações com dados genéticos. No capítulo 1, foi explorada a neuroimagem medular volumétrica e microestrutural da SCA2 em face de outras ataxias espinocerebelares, tendo sido incluídos 16 pacientes com SCA2, 26 pacientes com SCA3, 14 pacientes com SCA6 e 56 controles. No capítulo 2, estudou-se 15 pacientes com ELA esporádica, 16 pacientes com ELA-*ATXN2*, 17 pacientes com SCA2 e 34 controles, utilizando-se neuroimagem estrutural com técnicas avançadas do cérebro, cerebelo e medula espinhal, bem como análise do padrão lesional em face do mapa de expressão gênica *Allen Brain Atlas*. No capítulo 1, os resultados evidenciaram redução da área seccional medular e alterações de parâmetros de DTI na SCA2 e SCA3 com comprometimento mais significativo da coluna dorsal na SCA2. Não foram observadas diferenças entre pacientes com SCA6 e controles. No capítulo 2 os resultados evidenciaram padrões diferentes de neuroimagem em pacientes com ELA, ELA-*ATXN2* e SCA2. Em SCA2, observou-se atrofia significativa do cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal, enquanto na ELA-*ATXN2* o comprometimento predominante foi medular e do tronco, sem envolvimento cerebelar relevante. A sobreposição entre os mapas de expressão do *ATXN2* e as áreas de atrofia em SCA2 pode sugerir toxicidade relacionada a ganho de função da proteína mutada. Na ELA-*ATXN2*, os achados indicam mecanismos fisiopatológicos distintos, possivelmente mediados pela interação entre ataxina-2, TDP-43 e outros fatores. Este estudo destaca a importância da neuroimagem estrutural como ferramenta para diferenciação diagnóstica e como potencial biomarcador, contribuindo para o melhor entendimento da fisiopatologia das doenças associadas ao gene *ATXN2*.

Palavras-chave: Ataxia Espinocerebelar Tipo 2. Esclerose Lateral Amiotrófica. Ataxina-2. Neuroimagem. Doenças da Medula Espinal. Imageamento por Ressonância Magnética. Biomarcadores.

ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are incurable neurodegenerative disorders. Both are linked through pathogenic expansions in the *ATXN2* gene: large expansions (>34 CAG repeats) cause SCA2, whereas intermediate expansions (27–34 repeats) increase the risk for ALS, a condition referred to as “*ATXN2*-associated ALS” (ALS-*ATXN2*). Gaps remain in our understanding of the anatomical overlap between these disorders and of the pathophysiological relationships among ALS, ALS-*ATXN2*, and SCA2, as well as between SCA2 and other conditions within the spinocerebellar ataxia spectrum. This thesis aimed to characterize patients with SCA2 and ALS-*ATXN2* from a clinical and advanced structural neuroimaging perspective, exploring phenotypic differences, imaging patterns, and correlations with genetic data. In Chapter 1, we investigated volumetric and microstructural spinal cord imaging in SCA2 compared with other spinocerebellar ataxias, including 16 patients with SCA2, 26 with SCA3, 14 with SCA6 and 56 healthy controls. In Chapter 2, we studied 15 patients with sporadic ALS, 16 with ALS-*ATXN2*, 17 with SCA2, and 34 controls, using advanced structural neuroimaging of the brain, cerebellum, and spinal cord, alongside lesion pattern analysis in relation to Allen Brain Atlas gene expression maps. In Chapter 1, results showed spinal cord cross-sectional area reduction and diffusion tensor imaging abnormalities in both SCA2 and SCA3, with more pronounced dorsal column involvement in SCA2. No significant differences were observed between patients with SCA6 and controls. In Chapter 2, distinct neuroimaging patterns were identified across ALS, ALS-*ATXN2*, and SCA2. In SCA2, there was marked atrophy of the cerebellum, brainstem, and spinal cord; in ALS-*ATXN2*, the predominant involvement was in the spinal cord and brainstem, with no relevant cerebellar atrophy. The spatial overlap between *ATXN2* expression maps and regions of atrophy in SCA2 suggests a toxic gain-of-function effect of the mutant protein. In contrast, findings in ALS-*ATXN2* indicate distinct pathophysiological mechanisms, possibly mediated by the interaction between ataxin-2, TDP-43, and other molecular factors. This work highlights the role of advanced structural neuroimaging as a tool for differential diagnosis and as a potential biomarker, contributing to a deeper understanding of the pathophysiology of *ATXN2*-related disorders.

Keywords: Spinocerebellar Ataxia Type 2. Amyotrophic Lateral Sclerosis. Ataxin-2. Neuroimaging. Spinal Cord Diseases. Magnetic Resonance Imaging. Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Representação esquemática da estrutura da proteína Ataxina-2 humana. A proteína é composta por regiões funcionais distintas, incluindo: dois domínios LSm (Like-Sm), envolvidos na regulação pós-transcricional de RNA; um domínio PAM2 (PABP-interacting motif 2), responsável pela interação com a proteína ligadora de poli(A); e uma região central codificada pelo exon 1 que contém uma sequência repetitiva de tripletos CAG, traduzida em uma cadeia de poliglutaminas (PQ)(1).

FIGURA 2: À esquerda na figura, tabela descrevendo o tamanho amostral de cada grupo do capítulo 1, com 16 pacientes SCA2, 26 pacientes SCA3, 14 pacientes SCA6 e 56 controles e à direita ilustração da organização das análises comparativas entre grupos.

FIGURA 3: À esquerda na figura, tabela descrevendo o tamanho amostral de cada grupo do capítulo 2, com 15 pacientes com ELAe, 16 pacientes com ELA-ATXN2, 17 pacientes com SCA2 e 34 controles e à direita ilustração da organização das análises comparativas entre grupos.

FIGURA 4: Fluxograma ilustrativo do racional que conecta os dois capítulos da tese. A constatação que pacientes com ELA tem um fator genético complexo, incluindo o gene *ATXN2* como fator de risco, nos leva a questionar qual o substrato anatômico dos diferentes genótipos associados fenotipicamente, e se há padrões de lesão confluentes ou divergentes. Finalmente nesse raciocínio a neuroimagem avançada se destaca como ferramenta para esclarecimento da pergunta de pesquisa, como empregado na tese.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD: do inglês axial diffusivity

ALSFRS-R: do inglês Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale–Revised

ATXN2: gene, do inglês ataxin 2

C9ORF72: gene, do inglês chromosome 9 open reading frame 72

CSA: área de segmento transversal, do inglês cross-sectional area

ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica

ELA-ATXN2: Esclerose Lateral Amiotrófica relacionada ao gene ATXN2

ELAe: Esclerose Lateral Amiotrófica esporádica

ELAf: Esclerose Lateral Amiotrófica familiar

FA: do inglês fractional anisotropy

FUS: gene, do inglês fused in sarcoma

MD: do inglês mean diffusivity

RD: do inglês radial diffusivity

SARA: do inglês Scale for the Assessment and Rating of Ataxia

SCA: Ataxia espinocerebelar, do inglês spinocerebellar ataxia

SCA1: Ataxia espinocerebelar tipo 1, do inglês spinocerebellar ataxia type 1

SCA2: Ataxia espinocerebelar tipo 2, do inglês spinocerebellar ataxia type 2

SCA3: Ataxia espinocerebelar tipo 3, do inglês spinocerebellar ataxia type 3

SCA6: Ataxia espinocerebelar tipo 6, do inglês spinocerebellar ataxia type 6

SOD1: gene, do inglês superoxide dismutase 1

TARDBP: gene, do inglês TAR-DNA binding protein

VAPB: gene, do inglês vesicle-associated membrane protein–associated protein B

SUMÁRIO

Justificativa de Originalidade do Trabalho.....	12
1. Introdução.....	14
1.1 Contextualização das Doenças Heredodegenerativas.....	14
1.2 O gene <i>ATXN2</i> e doenças associadas.....	17
1.3 SCA2: características clínicas e moleculares e paralelo com outras SCAs.....	21
1.4 ELA- <i>ATXN2</i> : características clínicas e moleculares.....	23
1.5 Neuroimagem avançada e potenciais biomarcadores.....	27
2. Objetivos.....	30
3. Métodos.....	31
4. Resultados.....	36
4.1 Capítulo 1: Artigo neuroimagem medular em SCA2.....	36
4.2 Capítulo 2: Artigo neuroimagem em SCA2, ELA e ELA- <i>ATXN2</i>	46
5. Discussão Geral.....	61
6. Conclusão.....	71
7. Referências.....	72
8. Anexos.....	87

Justificativa de Originalidade do Trabalho

A intersecção entre ELA-*ATXN2* e SCA2 representa um desafio fundamental na compreensão das doenças neurodegenerativas associadas ao gene *ATXN2*. Apesar de ambas compartilharem um mecanismo genético comum, com expansões de CAG neste gene, a forma e a distribuição da degeneração neuronal diferem substancialmente. A SCA2 é predominantemente caracterizada por degeneração cerebelar e do tronco encefálico, enquanto a ELA-*ATXN2* afeta predominantemente o trato corticoespinhal e os neurônios motores inferiores. A SCA2 se aproxima clinicamente muito mais dos seus pares, como outras ataxias espinocerebelares, como a SCA3 e a SCA6, sem um paralelo óbvio em pacientes com ELA. No entanto, os mecanismos que determinam essa diferenciação fenotípica ainda não foram completamente esclarecidos, e a base anatômica para a sobreposição parcial entre essas condições permanece pouco compreendida.

Os estudos de neuroimagem disponíveis sobre ELA e SCAs têm avançado na caracterização estrutural e funcional dessas doenças, mas a maioria das investigações concentra-se no encéfalo, com foco na atrofia cortical, cerebelar e do tronco encefálico. Pouca atenção tem sido dada ao papel da medula espinhal, uma estrutura crítica para a funcionalidade motora e que pode ser central para entender a degeneração diferenciada entre SCA2 e ELA-*ATXN2*. Evidências emergentes indicam que a medula cervical apresenta atrofia significativa em SCA2 e que pacientes com ELA-*ATXN2* podem ter padrões distintos de degeneração medular em comparação com a ELAe, mas esses achados ainda não foram devidamente explorados em um estudo sistemático e comparativo.

Dessa forma, a originalidade desta pesquisa reside na investigação detalhada da neuroimagem da medula espinhal e sua interface com as estruturas supramedulares em pacientes com SCA2 e ELA-*ATXN2*, contemplando ainda a caracterização comparativa de achados em SCA3 e SCA6, de modo a contextualizar o espectro mais amplo das ataxias espinocerebelares. A ausência de estudos que correlacionem os achados estruturais da medula espinhal com a degeneração do encéfalo nesses pacientes justifica a necessidade de um estudo abrangente que avalie padrões de atrofia, alterações microestruturais e sua

relação com os diferentes espectros da doença. A compreensão dessas diferenças pode contribuir para esclarecer os mecanismos que tornam determinadas populações neuronais mais vulneráveis à degeneração, além de possibilitar a identificação de biomarcadores radiológicos que possam ser utilizados tanto para o diagnóstico diferencial quanto para o monitoramento da progressão dessas doenças.

Além disso, um dos aspectos mais inovadores desse estudo é a possibilidade de correlacionar os achados de neuroimagem com a expressão gênica do *ATXN2* no sistema nervoso central. Estudos anteriores sugerem que a distribuição da expressão desse gene pode estar diretamente relacionada aos padrões de atrofia observados na SCA2, mas essa relação ainda não foi explorada no contexto da ELA-*ATXN2*. A caracterização detalhada dessas assinaturas radiológicas e sua integração com dados de expressão genética pode oferecer novos insights sobre os mecanismos de neurodegeneração mediados por *ATXN2*, ajudando a responder questões fundamentais sobre a patogênese dessas doenças.

Portanto, este estudo preenche uma lacuna crítica na literatura ao integrar metodologias avançadas de neuroimagem para investigar a interface entre SCA2 e ELA-*ATXN2* nunca explorada de uma forma abrangente, incluindo a análise da medula espinhal da SCA2 em face de pacientes com SCA3 e SCA6 e sua relação com o restante do sistema nervoso central. O impacto potencial dessa pesquisa é significativo, pois pode contribuir para o desenvolvimento de novos biomarcadores estruturais e microestruturais, fundamentais para um diagnóstico mais preciso e para futuras estratégias terapêuticas voltadas para a modulação da expressão do *ATXN2*. Além disso, ao estabelecer parâmetros quantitativos de atrofia e disfunção neural nessas doenças, o estudo pode auxiliar na estratificação precoce de pacientes e no desenho de ensaios clínicos direcionados a intervenções específicas para diferentes formas de neurodegeneração associadas ao *ATXN2*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização das Doenças Heredodegenerativas

As doenças neurodegenerativas representam um grupo diverso de enfermidades caracterizadas pela degeneração progressiva e seletiva de populações neuronais do sistema nervoso central e/ou periférico (2,3). Essas patologias têm impacto substancial na qualidade de vida dos pacientes e frequentemente resultam em comprometimento motor, cognitivo e autonômico(4). Dentre as doenças neurodegenerativas, aquelas cuja causa básica é genética são denominadas de heredodegenerativas, cursando com múltiplos padrões de herança e curso clínico progressivo, em geral irreversível(5).

Doenças como Alzheimer, Parkinson, demência com corpos de Lewy, ELA, doença de Huntington e as ataxias espinocerebelares compartilham mecanismos patológicos semelhantes, como deposição de proteínas mal dobradas, disfunção mitocondrial e neuroinflamação crônica(4,6). A doença de Alzheimer, por exemplo, é caracterizada pelo acúmulo de placas de β -amiloide e emaranhados neurofibrilares de tau, resultando em neurodegeneração cortical e comprometimento cognitivo progressivo(7,8). Já a doença de Parkinson está associada à degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra e acúmulo de α -sinucleína, levando a sintomas motores característicos(9,10). Outras patologias, como a doença de Huntington, são causadas por expansões de repetições trinucleotídicas, que resultam em disfunção e morte neuronal(11,12).

O processo neurodegenerativo pode ser impulsionado por diversos mecanismos celulares e moleculares. O acúmulo de proteínas mal dobradas é um fenômeno comum a várias doenças, como tauopatias na doença de Alzheimer e sinucleinopatias na doença de Parkinson. A disfunção mitocondrial também desempenha um papel central, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo e a redução da produção de ATP, levando à apoptose neuronal(13). Além disso, a neuroinflamação mediada por ativação crônica da micróglia e astrócitos está fortemente implicada na progressão dessas doenças, exacerbando o dano neuronal.

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma das principais doenças do neurônio motor, caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios

motores superiores e inferiores. A perda dessas células leva à fraqueza muscular progressiva, disartria, disfagia e, eventualmente, insuficiência respiratória, que representa a principal causa de óbito na doença(14–16). Embora a maioria dos casos seja esporádica, aproximadamente 10% possuem etiologia genética, com variantes patogênicas em genes como *SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP* e *FUS* sendo as causas mais comuns neste último subgrupo(17,18). A patogênese da ELA envolve um complexo conjunto de mecanismos, incluindo acúmulo anômalo de proteínas, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo(19). Estudos recentes também têm demonstrado que a ELA compartilha vias fisiopatológicas com a demência frontotemporal, sugerindo uma sobreposição fenotípica e molecular entre essas doenças(18,20). A busca por biomarcadores e tratamentos neuroprotetores continua sendo um dos grandes desafios na pesquisa da ELA(21).

As ataxias espinocerebelares (SCAs) representam um grupo heterogêneo de desordens hereditárias degenerativas, caracterizadas pela degeneração progressiva do cerebelo e suas conexões(22). Essas doenças são causadas por mutações em diferentes genes, sendo muitas delas associadas a expansões de repetições trinucleotídicas em porções codificantes de diversos genes, como ocorre na SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6(22,23). A manifestação clínica inclui ataxia progressiva, disartria, dismetria e oftalmoparesia, variando em gravidade conforme o subtipo genético(24). Além da disfunção cerebelar primária, estudos recentes sugerem que algumas SCAs também apresentam comprometimento extra-cerebelar, afetando estruturas como o tronco encefálico e a medula espinhal(23,25–27). A neuroimagem tem desempenhado um papel fundamental na caracterização dessas doenças, permitindo a identificação de padrões específicos de atrofia e disfunção neuronal(28,29). Compreender os mecanismos patogênicos subjacentes às SCAs é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de retardar a progressão da doença.

A genética desempenha um papel essencial na patogênese das doenças neurodegenerativas. Algumas delas apresentam padrões monogênicos de herança, como a doença de Huntington, causada por mutações no gene *HTT*(11), e a SCA2, associada a expansões no gene *ATXN2* (30). Outras

doenças, como Alzheimer e Parkinson, se apresentam usualmente de forma esporádica, mas sabe-se atualmente que existem variantes genéticas de risco, como polimorfismos nos genes *APOE ε4* na doença de Alzheimer(7) e *LRRK2* na doença de Parkinson(9). Estas doenças, portanto, são hoje consideradas como doenças com substrato genético oligo ou poligênico, ou seja, há variantes genéticas que conferem aumento de risco, mas que precisam da interação de fatores ambientais para o desenvolvimento da enfermidade. A epigenética também tem sido um campo emergente de pesquisa, com modificações na metilação do DNA e na regulação de RNAs não codificantes sendo reconhecidas como potenciais moduladores da neurodegeneração(31,32).

Entre as doenças hereditárias associadas à degeneração neuronal, SCA2 e ELA representam exemplos paradigmáticos de como variantes genéticas num mesmo gene podem levar a fenótipos distintos dentro de um espectro compartilhado de neurodegeneração(30,33,34). Ambas as doenças compartilham mecanismos comuns, como a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e o envolvimento de proteínas mal dobradas, sugerindo que aspectos fisiopatológicos comuns podem estar subjacentes a diferentes apresentações clínicas. O gene *ATXN2*, por exemplo, tem sido implicado não apenas na SCA2, mas também como fator de risco para ELA, reforçando a complexidade da relação entre genética e neurodegeneração(30,35). A compreensão dessa interseção entre as diferentes doenças hereditárias degenerativas é essencial para o avanço no diagnóstico e no desenvolvimento de novas terapias(36).

Evidências recentes têm demonstrado que a distinção rígida entre ELA-*ATXN2* e SCA2 pode ser artificial. Ambas compartilham mecanismos moleculares comuns, associados a expansões no gene *ATXN2* e a presença de inclusões citoplasmáticas de TDP-43, diferenciando-se, sobretudo, pela topografia e pelo momento do início dos sintomas (30,35,37–39). Nessa perspectiva, o comprimento da repetição CAG em *ATXN2* parece influenciar menos a natureza do processo neurodegenerativo do que o seu timing relativo sobre circuitos cerebelares e motores, possibilitando apresentações sobrepostas ou mesmo simultâneas(40).

Considerar ELA e SCA2 como parte de um espectro contínuo de neurodegeneração amplia a compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos

e ressalta a importância de investigações voltadas à caracterização do substrato neuroanatômico comum, com potencial impacto no diagnóstico, prognóstico e desenvolvimento de biomarcadores.

Dessa forma, a investigação das características estruturais e funcionais do SNC em SCA2 e ELA, utilizando abordagens de neuroimagem e biomarcadores moleculares, pode contribuir para um melhor entendimento da heterogeneidade fenotípica dessas condições. Nos capítulos seguintes, serão exploradas as assinaturas neurais específicas dessas doenças, bem como os métodos empregados para sua avaliação, buscando integrar aspectos clínicos, genéticos e de imagem na caracterização de sua fisiopatologia.

1.2 O gene *ATXN2* e doenças associadas

O gene *ATXN2* está localizado no cromossomo 12q24.12 e codifica a proteína ataxina-2, uma proteína citoplasmática amplamente expressa no sistema nervoso central, com papel essencial na homeostase neuronal(38,41). A sequência codificante deste gene contém uma região polimórfica de repetições CAG, que variam normalmente entre 22 e 31 repetições em indivíduos saudáveis(30). Expansões acima desse limite estão associadas a doenças neurodegenerativas, como a ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2) e ELA-*ATXN2*(30,35,42).

A ataxina-2 é uma proteína multifuncional (**Figura 1**), envolvida no metabolismo do RNA, na formação de grânulos de estresse, na sinalização do cálcio e na homeostase proteica. A regulação da tradução de RNAs ocorre por meio da interação da ataxina-2 com proteínas de ligação ao RNA, como PABP-1, influenciando a estabilidade e a tradução de transcritos específicos(41,43). Além disso, a ataxina-2 participa da modulação de vias metabólicas essenciais, como a resposta ao estresse oxidativo e a homeostase mitocondrial, prevenindo disfunções que podem levar à neurodegeneração(44).

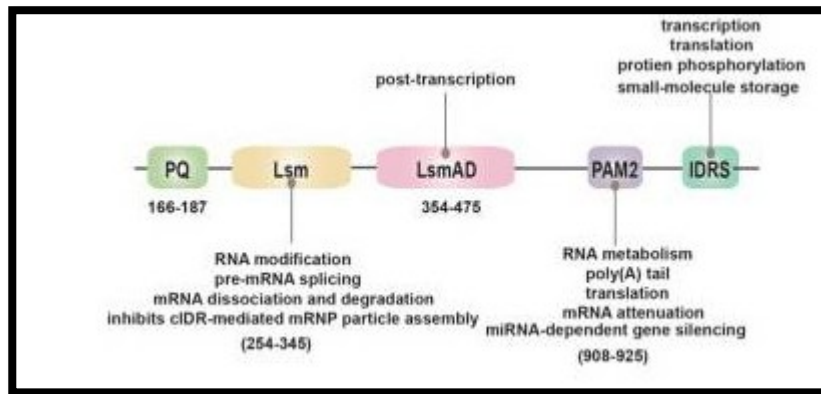


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da proteína Ataxina-2 humana. A proteína é composta por regiões funcionais distintas, incluindo: dois domínios LSm (Like-Sm), envolvidos na regulação pós-transcricional de RNA; um domínio PAM2 (PABP-interacting motif 2), responsável pela interação com a proteína ligadora de poli(A); e uma região central codificada pelo exon 1 que contém uma sequência repetitiva de tripletos CAG, traduzida em uma cadeia de poliglutaminas (PQ) (1).

A proteína ataxina-2 possui domínios estruturais importantes que contribuem para suas funções fisiológicas(45). Destacam-se o domínio Lsm (Like-Sm), responsável pela interação com RNAs, e a região PAM2, que permite a associação com proteínas de ligação ao poli(A)(46). A ataxina-2 também desempenha um papel fundamental na regulação do tráfego intracelular e na degradação de proteínas por meio do sistema de autofagia, garantindo a estabilidade proteica e prevenindo o acúmulo de proteínas mal dobradas(47). Além disso, estudos demonstram que essa proteína participa ativamente da regulação da sinalização do cálcio neuronal, modulando a excitabilidade celular e contribuindo para a plasticidade sináptica(30,48).

A presença de expansões patogênicas de CAG em *ATXN2* altera a conformação e função da proteína, promovendo agregação proteica, toxicidade de RNA e desregulação de processos celulares fundamentais(30). Em SCA2, essas alterações resultam na degeneração progressiva do cerebelo e tronco encefálico, com perda significativa de neurônios de Purkinje e deterioração das conexões corticoespinhais(49–51). Além disso, expansões intermediárias (27-34 repetições CAG) têm sido associadas a um aumento do risco de desenvolver ELA, possivelmente devido à interação da ataxina-2 com proteínas envolvidas na patogênese da doença, como TDP-43(52,53).

Como desdobramento dessa relação, estudos clínicos consolidam que alelos intermediários de *ATXN2* estão associados tanto a maior risco de ELA quanto a efeitos modificadores de prognóstico. Em coortes italianas, repetições ≥ 31 CAG foram mais frequentes em pacientes e associaram-se a redução de aproximadamente 1 ano na sobrevida mediana, efeito que se manteve após ajuste multivariado e foi replicado em coorte de validação, caracterizando o alelo intermediário como modificador de desfecho na ELA(54,55). Na população brasileira, expansões intermediárias aumentaram o risco de ELA, sem um fenótipo clínico distintivo em relação aos casos negativos para *ATXN2*(34,56).

Em nível mecanístico, dados experimentais recentes mostram que expansões intermediárias de *ATXN2* sequestram TDP-43 em condensados ribonucleoproteicos, perturbam seu transporte axonal e suprimem a tradução local de mRNAs, especialmente em axônios de neurônios motores, oferecendo um elo plausível entre genética e vulnerabilidade de circuitos motores(53,57,58). Os mecanismos fisiopatológicos da disfunção da ataxina-2 incluem a disfunção mitocondrial, que leva a um aumento do estresse oxidativo e a uma falha na bioenergética neuronal(30,35,45). Outro aspecto fundamental é a toxicidade de RNA mediada por interações aberrantes com proteínas de ligação ao RNA, alterando a expressão de genes essenciais para a viabilidade celular (59). Além disso, há um acúmulo de proteínas mal dobradas, formando inclusões neuronais que prejudicam a função celular e contribuem para a morte neuronal(30).

O gene *ATXN2* apresenta diferentes tipos de mutações associadas a doenças neurodegenerativas. A mais estudada é a expansão do trinucleotídeo CAG, que resulta em uma forma alongada da proteína ataxina-2, levando a disfunções celulares progressivas(45). Outras variações genéticas, como mutações pontuais e deleções, embora não tipicamente associadas com doenças também podem impactar a funcionalidade da proteína e contribuir para a susceptibilidade a patologias como glaucoma e num espectro teórico outras doenças neurológicas(60,61).

As expansões patogênicas do gene *ATXN2* podem levar a diferentes consequências celulares, dependendo do tamanho da repetição CAG. Em SCA2, os longos tratos de poliglutamina provocam alterações conformacionais na ataxina-2, favorecendo sua agregação e afetando a dinâmica dos grânulos

de estresse(30,62). Além disso, essa mutação compromete a interação da proteína com componentes da via autofágica, reduzindo a capacidade celular de eliminar proteínas tóxicas acumuladas(63).

Já em ELA-*ATXN2*, as expansões intermediárias (27-34 CAG) parecem modular a função da proteína sem necessariamente induzir agregação proteica, mas promovem alterações na homeostase do RNA e aumentam a vulnerabilidade neuronal ao estresse oxidativo(39,45). A interação entre a ataxina-2 e a proteína TDP-43 desempenha um papel central nesse contexto, pois a desregulação dessa interação contribui para o acúmulo de agregados de TDP-43, um dos principais marcadores patológicos da ELA(64–66).

A variabilidade genética de *ATXN2* reflete-se no espectro clínico das doenças associadas. Expansões patogênicas acima de 32 repetições CAG causam SCA2, enquanto variantes intermediárias (27-34 CAG) aumentam a suscetibilidade a ELA(35). Estudos experimentais em modelos celulares e animais demonstram que a redução da expressão de *ATXN2* mutada pode atenuar os processos neurodegenerativos, o que reforça seu papel central na fisiopatologia dessas doenças (30,64,65,67).

As estratégias terapêuticas atuais para doenças associadas a *ATXN2* incluem oligonucleotídeos antisense, que visam reduzir a expressão da proteína ataxina-2, minimizando seus efeitos patogênicos(68,69). Além disso, há um interesse crescente na modulação farmacológica de vias metabólicas alteradas, como a homeostase do cálcio e a resposta ao estresse celular(30,57,62). A identificação de biomarcadores moleculares e o uso de neuroimagem avançada têm sido explorados para melhorar o diagnóstico e monitoramento da progressão dessas doenças(70–73).

Na ELA, podemos citar alguns biomarcadores estudados além da neuroimagem. Os neurofilamentos em líquido e sangue tem algum valor diagnóstico e prognóstico, mas não são específicos de doença(21,74). Complementarmente, há marcadores farmacodinâmicos em subgrupos genéticos, como por exemplo no caso da atividade da enzima superóxido-dismutase tipo 1 em pacientes com mutação no gene *SOD1*, porém exemplos como esse são restritos para formas monogênicas específicas(21). Por fim, técnicas de neurofisiologia clínica permitem o diagnóstico e auxiliam no acompanhamento da evolução da doença,

como é o caso da amplitude dos potenciais de ação musculares compostos, índice neurofisiológico e miografia por impedância elétrica, entretanto são técnicas que avaliam essencialmente o neurônio motor inferior(75).

O diferencial da neuroimagem como biomarcador é oferecer, in vivo, de forma não invasiva, mapeamento espacial da neurodegeneração no sistema nervoso central, auxiliando no diagnóstico, estratificação fenotípica e obtendo medidas quantitativas de progressão em todos os subgrupos da doença(73,76–78).

A compreensão aprofundada da biologia de *ATXN2* e seus impactos na neurodegeneração continua sendo um campo essencial de pesquisa, com potencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras e estratégias preventivas para doenças do espectro *ATXN2* (45).

1.3 SCA2: características clínicas, moleculares e paralelo com outras SCAs

A ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2) é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante caracterizada por um fenômeno de repetição de trinucleotídeos CAG no gene *ATXN2*, resultando na expressão de uma proteína ataxina-2 expandida, cujo acúmulo leva à disfunção neuronal progressiva(79). Historicamente, a SCA2 foi descrita pela primeira vez na Índia por Wadia e Swami em 1971, quando identificaram uma forma particular de ataxia hereditária associada a movimentos sacádicos oculares anormalmente lentos(30). Posteriormente, a doença foi amplamente estudada em Cuba, onde ocorre uma das maiores prevalências globais devido a um efeito fundador, permitindo o desenvolvimento de um arcabouço clínico e genético detalhado da condição(80). Em 1996, três grupos independentes de pesquisa nos Estados Unidos, Japão e França identificaram o gene *ATXN2* como o responsável pela doença, estabelecendo o padrão de herança dominante e a correlação entre o número de repetições CAG e a idade de início da doença(30).

O quadro clínico da SCA2 é dominado por uma síndrome cerebelar progressiva, manifestando-se principalmente por ataxia de marcha e disartria(79,81). Além disso, é comum a presença de movimentos oculares sacádicos lentos, um achado precoce e altamente sugestivo da doença(81,82). Outros sinais motores incluem tremor de ação, hiporreflexia precoce, mioclonia e câibras musculares(80). A evolução clínica leva ao comprometimento progressivo da mobilidade, culminando em necessidade de auxílio para deambulação em

estágios avançados(83). Pacientes também podem apresentar sintomas extrapiramidais, incluindo rigidez e bradicinesia, eventualmente com fenótipos parkinsonianos associados a neuropatia motora(84–88). A neuropatia periférica é outro achado comum, frequentemente resultando em arreflexia dos membros inferiores(89,90). Distúrbios do sono, incluindo síndrome das pernas inquietas, e disfunções autonômicas como incontinência urinária e disfunção sudomotora, são frequentes(91–93). Comprometimento cognitivo leve a moderado pode ocorrer, geralmente afetando a memória de curto prazo e funções executivas(94,95).

Do ponto de vista fisiopatológico, a SCA2 está associada à formação de agregados proteicos da ataxina-2 expandida no cérebro e na medula espinhal. Estudos indicam que essa proteína interage com várias vias celulares, incluindo o metabolismo de RNA, o transporte axonal e a homeostase de cálcio(30,45). A disfunção da ataxina-2 afeta as células de Purkinje no cerebelo, os neurônios dopaminérgicos da substância negra e estruturas do tronco encefálico, levando às manifestações clínicas da doença(96,97).

O diagnóstico da SCA2 é confirmado por análise molecular do gene *ATXN2*, que identifica a expansão patogênica do CAG. Exames complementares incluem ressonância magnética, que pode revelar atrofia cerebelar e do tronco encefálico, com o típico achado denominado “hot-cross-bun-sign”(71,72). A eletroneuromiografia pode auxiliar na avaliação da neuropatia periférica frequentemente presente(98). O prognóstico da doença é geralmente reservado dada sua evolução progressiva, com redução significativa da mobilidade e do tempo de sobrevida em casos com maiores expansões de CAG(81,99).

Atualmente, não há cura para a SCA2, e o tratamento é predominantemente sintomático(100). A fisioterapia desempenha um papel fundamental na manutenção da mobilidade e na prevenção de contraturas(101,102). Medicamentos dopaminérgicos podem ser benéficos em pacientes com sintomas parkinsonianos(85), enquanto fármacos como o riluzol foram investigados por seu potencial neuroprotetor, embora com resultados negativos (103). Estudos recentes indicam que terapias baseadas em RNA, como o silenciamento de *ATXN2* por oligonucleotídeos antisense, representam uma estratégia promissora para retardar a progressão da doença(68). Ensaios

clínicos estão em andamento para avaliar novas abordagens terapêuticas, incluindo terapia gênica e modulação de vias celulares alteradas pela ataxina-2 expandida(104,105). O avanço do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da SCA2 e o desenvolvimento de biomarcadores sensíveis são cruciais para futuras intervenções terapêuticas direcionadas.

A ataxia cerebelar é a manifestação comum da SCA2, SCA3 e SCA6, embora cada uma apresente particularidades clínicas e moleculares: A SCA3 é a forma mais prevalente e mais bem estudada sem a alteração oculomotora típica da SCA2, podendo se apresentar com parkinsonismo, distonia entre outros(106). A SCA6 costuma ter início tardio e curso mais restrito ao cerebelo(22). Apesar da ampla literatura sobre neuroimagem encefálica de SCA2 e SCA3, os estudos de neuroimagem medular são ainda escassos em SCA3 e SCA2 e inexistentes em SCA6.

1.4 ELA-ATXN2: características clínicas e moleculares

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, de etiologia multifatorial e impacto devastador, caracterizada pela degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores(14,16). Esse processo leva a uma fraqueza muscular insidiosa e progressiva, resultando em atrofia muscular, espasticidade, fasciculações, comprometimento respiratório e, eventualmente, óbito(20). Apesar dos avanços no entendimento da doença, os mecanismos fisiopatológicos que regem sua evolução ainda não estão completamente elucidados(107).

Desde sua primeira descrição por Jean-Martin Charcot em 1869, a ELA tem sido objeto de intensa investigação, sobretudo nos aspectos clínicos, genéticos e terapêuticos(108). Inicialmente, acreditava-se tratar-se de uma patologia esporádica e de causa desconhecida, mas, com o avanço das técnicas de biologia molecular e sequenciamento genético, tornou-se evidente que fatores genéticos desempenham um papel crítico na suscetibilidade ao desenvolvimento da doença(109).

Estudos revelaram que aproximadamente 10% dos casos de ELA são familiares, associados a mutações em genes como *C9orf72*, *SOD1*, *FUS* e *TARDBP* (110,111), acrescentando-se o gene *VAPB* com grande relevância no Brasil(56,112), enquanto a grande maioria dos pacientes apresenta formas

esporádicas, nas quais fatores genéticos e ambientais interagem para determinar a progressão da doença (109,113).

Dentre as descobertas genéticas mais relevantes das últimas décadas, destaca-se o papel do gene *ATXN2*, previamente relacionado à ataxia SCA2, no risco para ELA(34,35,37,39,55,114–121). O gene *ATXN2* contém uma sequência polimórfica de repetições do trinucleotídeo CAG, que codifica um segmento poliglutamina na proteína ataxina-2. Diversos estudos, ilustrados na **tabela 1**, demonstraram que indivíduos com expansões intermediárias do CAG, na faixa de 27 a 34 repetições, apresentam risco significativamente aumentado de desenvolver ELA(30,35).

Tabela 1 - Estudos que associam a ELA com expansões intermediárias *ATXN2*

Estudo	País	Observações Relevantes
Elden et al, 2010 (42)	EUA	Portadores tiveram início mais precoce.
Van Damme et al, 2011 (37)	Bélgica	Fenótipo heterogêneo.
Lee et al, 2011 (118)	Europa multicêntrico	Extensão europeia multicêntrica do achado original.
Daoud et al, 2011 (39)	Quebec/França	Incluiu outras formas monogênicas de ELA.
Lahut et al, 2012 (119)	Turquia	Incluiu estudo de polimorfismos.
Conforti et al, 2012 (120)	Itália	Avaliou também gene <i>ATXN1</i> .
Liu et al, 2013(117)	China	Sugere limiar de 30 repetições para população chinesa.
Neuenschwander, 2014 (122)	Metanálise	Confirma associação multipopulacional, sugere maior evidência acima de 31 repetições.
Lu et al, 2015 (121)	China	Inclui leste da China, com limiares diferentes (>27)
Borghero et al, 2015 (55)	Itália	Postula como modificador de fenótipo.
Tan et al, 2016 (116)	Austrália	

Sproviero et al, 2017 (115)	Metanálise	Sugere 29-32 repetições como maior risco.
Tavares de Andrade et al, 2018 (34)	Brasil	Primeira evidência sul-americana.

Estudos populacionais que investigaram e comprovaram a associação entre expansões intermediárias no gene *ATXN2* com a ELA. A tabela lista os estudos, região e observações relevantes.

Esse achado revelou uma sobreposição patogênica entre os espectros das ataxias espinocerebelares e das doenças do neurônio motor(37,123).

A proteína ataxina-2 está envolvida na homeostase do RNA, no metabolismo celular e na resposta ao estresse, e suas expansões anormais promovem interações aberrantes com a proteína TDP-43, um dos principais marcadores patológicos da ELA(65). Modelos experimentais demonstraram que a redução da expressão de *ATXN2* mutada atenua a toxicidade mediada por TDP-43 e prolonga a sobrevida em modelos animais da doença, sugerindo que essa via pode representar um alvo terapêutico promissor para futuras intervenções(52,64,65).

O diagnóstico da ELA segue critérios clínicos e neurofisiológicos bem estabelecidos, sendo os critérios revisados de El Escorial e mais recentemente critérios de Gold Coast amplamente utilizados para definir a presença de degeneração simultânea de neurônios motores superiores e inferiores em múltiplos territórios anatômicos(124). A eletroneuromiografia desempenha um papel central na confirmação diagnóstica, evidenciando sinais de desnervação ativa e crônica em diferentes segmentos musculares(125–127).

A fisiopatologia conhecida da ELA consiste em uma cadeia de mecanismos de excitotoxicidade, desbalanço proteostático, disfunção mitocondrial, neuroinflamação e agregação proteica(14–16). A interação entre *ATXN2* e TDP-43 parece ser crítica para a patogênese da doença, uma vez que modelos celulares e animais demonstraram que a modulação da expressão de *ATXN2* pode influenciar diretamente o curso da neurodegeneração. Além disso, investigações recentes apontam que expansões intermediárias do CAG em *ATXN2* não apenas aumentam o risco de ELA, mas também podem modular a resposta inflamatória e a função mitocondrial nos neurônios motores, sugerindo que a doença pode envolver múltiplas vias patológicas convergentes(30,45).

O prognóstico da ELA permanece reservado, com sobrevida média de 3 a 5 anos após o diagnóstico, sendo a falência respiratória a principal causa de morte(128). No entanto, estudos recentes sugerem que a presença de expansões intermediárias em *ATXN2* pode influenciar a taxa de progressão da doença, com algumas evidências apontando para um fenótipo mais agressivo e de progressão mais acelerada nesses pacientes(58,129). A estratificação molecular e genética da ELA torna-se, portanto, um componente essencial para o desenvolvimento de biomarcadores prognósticos e de novas estratégias terapêuticas.

O tratamento da ELA ainda é limitado e essencialmente paliativo. Atualmente, os únicos fármacos aprovados no Brasil que demonstraram impacto na sobrevida dos pacientes são o Riluzol (130,131), um modulador da neurotransmissão glutamatérgica, e o Edaravone(132), um antioxidante que reduz o impacto de radicais livres no processo neurodegenerativo. No contexto da ELA-*ATXN2*, terapias direcionadas à supressão da expressão do gene *ATXN2* vêm sendo exploradas, incluindo o uso de oligonucleotídeos antisense para reduzir os níveis da proteína ataxina-2, uma abordagem que demonstrou efeitos neuroprotetores em modelos experimentais(36). Além das estratégias farmacológicas, a abordagem multidisciplinar é crucial para garantir qualidade de vida aos pacientes, incluindo suporte ventilatório não invasivo, fisioterapia, fonoaudiologia e assistência nutricional(14,16).

A associação entre o gene *ATXN2* e a ELA representa um marco na compreensão da interface genética entre diferentes espectros de doenças neurodegenerativas. Embora avanços significativos tenham sido alcançados na caracterização clínica e molecular da ELA-*ATXN2*, muitas questões permanecem sem resposta, especialmente no que se refere aos mecanismos exatos pelos quais as expansões intermediárias do CAG desencadeiam a neurodegeneração. O desenvolvimento de biomarcadores específicos e a implementação de terapias gênicas personalizadas são desafios prementes para a pesquisa na área, e a compreensão detalhada da interação entre *ATXN2*, TDP-43 e outras vias patológicas poderá abrir novas perspectivas para o tratamento dessa doença fatal.

1.5 Neuroimagem avançada e potenciais biomarcadores

A ressonância magnética (RM) emergiu como uma das principais ferramentas de investigação estrutural e funcional do sistema nervoso central, sendo amplamente utilizada na caracterização de doenças neurodegenerativas(76). Baseando-se nos princípios da ressonância magnética nuclear, essa técnica explora as propriedades dos núcleos atômicos, predominantemente do hidrogênio, ao serem submetidos a um campo magnético intenso e a pulsos de radiofrequência(133).

O fenômeno físico subjacente à RM decorre do alinhamento dos spins nucleares em resposta ao campo magnético externo e da posterior emissão de sinais detectáveis quando os spins retornam ao estado basal após a excitação. A partir da manipulação dos parâmetros de aquisição, como tempo de repetição (TR) e tempo de eco (TE), diferentes contrastes podem ser obtidos, destacando propriedades específicas dos tecidos cerebrais, como a densidade de prótons, a relaxação longitudinal (T1) e transversal (T2), permitindo a identificação de alterações estruturais associadas a diversas patologias neurológicas(133,134).

Com o avanço das técnicas de neuroimagem, métodos quantitativos como a morfometria baseada em voxel (VBM), a análise de espessura cortical e a volumetria manual ou automatizada tornaram-se ferramentas essenciais para a detecção de padrões de atrofia cerebral em doenças neurodegenerativas(135). Essas abordagens possibilitam a quantificação precisa da perda tecidual em regiões específicas do cérebro e medula espinhal, sendo particularmente úteis no estudo da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e das Ataxias Espinocerebelares (SCAs)(71–73).

Além da volumetria, a imagem por tensor de difusão (DTI) representa um dos avanços mais significativos na neuroimagem, permitindo a avaliação da integridade microestrutural da substância branca ao quantificar a difusão anisotrópica das moléculas de água nos tratos nervosos(136). A análise de medidas como a FA e a MD tem sido amplamente empregadas na identificação de alterações pré-sintomáticas e na progressão da degeneração neuronal em doenças do neurônio motor e ataxias hereditárias(137,138).

Nos últimos anos, diversas pesquisas demonstraram a aplicabilidade da RM na identificação de biomarcadores estruturais e funcionais na ELA e nas

SCAs, com especial ênfase na detecção precoce de alterações neurodegenerativas antes da manifestação clínica dos sintomas(139,140). Na ELA, a volumetria cerebral revelou padrões de atrofia progressiva que envolvem primariamente o córtex motor e o trato corticoespinhal, além do comprometimento de estruturas subcorticais como o corpo caloso, o tálamo e os gânglios da base(73).

Além disso, a espectroscopia por RM, que avalia a composição bioquímica do tecido cerebral, revelou uma redução significativa dos níveis de N-acetilaspartato (NAA) no córtex motor, refletindo a degeneração neuronal característica da ELA(141). Outras anormalidades neuroquímicas incluem um aumento nos níveis de mio-inositol, um marcador de ativação glial, e alterações na relação glutamato/creatina, sugerindo um papel da excitotoxicidade na patogênese da doença(142).

No contexto das SCAs, a RM tem sido amplamente empregada para a caracterização da atrofia cerebelar e do tronco encefálico, características patológicas centrais dessas doenças. Estudos utilizando VBM e análise de espessura cortical demonstraram padrões específicos de neurodegeneração em cada subtipo de SCA, sendo a SCA2 particularmente associada a uma atrofia olivopontocerebelar precoce, com envolvimento adicional de estruturas supratentoriais, como o córtex pré-frontal e o hipocampo(143). A DTI revelou um padrão distinto de degeneração da substância branca na SCA2, com redução da FA nos pedúnculos cerebelares médios, no tálamo e no corpo caloso, refletindo a disfunção da conectividade inter-hemisférica e cortico-subcortical nesses pacientes(71). Esses achados sugerem que a neuroimagem por difusão pode representar um biomarcador sensível para rastreamento de portadores assintomáticos e para monitoramento da progressão da doença ao longo do tempo.

Além das técnicas convencionais de RM estrutural e de difusão, métodos funcionais como a ressonância magnética funcional (fMRI) e a conectividade funcional em estado de repouso (rs-fMRI) vêm sendo investigados como potenciais biomarcadores para doenças neurodegenerativas(144). Na ELA, estudos de fMRI demonstraram uma hiperatividade compensatória do córtex motor primário durante a execução de tarefas motoras, enquanto a rs-fMRI

revelou um padrão de desconexão funcional entre o córtex motor e outras regiões corticais e subcorticais, indicando um desarranjo progressivo das redes motoras e executivas(145,146). De forma semelhante, na SCA2, estudos utilizando rs-fMRI identificaram uma redução da conectividade funcional dentro do cerebelo e entre o cerebelo e as áreas frontoparietais, correlacionando-se com déficits motores e cognitivos nesses pacientes(147).

A busca por biomarcadores neuroimagem para a ELA e SCAs não se limita às técnicas de RM, mas também inclui métodos de neuroimagem molecular, como a tomografia por emissão de pósitrons (PET) e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). Na ELA, a PET com 18F-fluorodeoxiglicose demonstrou padrões de hipometabolismo em regiões motoras e pré-frontais, correlacionando-se com déficits motores e cognitivos, enquanto o uso de ligantes específicos para o sistema glutamatérgico tem sido explorado para avaliar o papel da excitotoxicidade na progressão da doença(148). Em portadores assintomáticos de SCA2, estudos de PET revelaram alterações metabólicas precoces no cerebelo e no tronco encefálico, sugerindo que esses métodos podem auxiliar na detecção precoce e na estratificação dos pacientes para futuras intervenções terapêuticas(71).

A aplicação da neuroimagem avançada na ELA e nas SCAs não apenas contribui para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessas doenças, mas também oferece ferramentas promissoras para a identificação de biomarcadores prognósticos e de resposta terapêutica. O desenvolvimento de técnicas quantitativas cada vez mais sensíveis e reproduzíveis permitirá uma melhor estratificação dos pacientes e a implementação de ensaios clínicos direcionados a terapias modificadoras da doença. A integração de dados multimodais, combinando neuroimagem estrutural, funcional e molecular, representa um dos principais desafios e promessas da pesquisa translacional na área das doenças neurodegenerativas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

1. Caracterizar o padrão de dano estrutural ao sistema nervoso central nas doenças relacionadas ao gene *ATXN2*.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar e comparar a gravidade e o padrão de danos da medula espinhal em pacientes com SCA2, SCA3 e SCA6 e controles usando técnicas de ressonância magnética multimodal.
2. Correlacionar os achados de neuroimagem estrutural medula espinhal com dados clínicos de pacientes com SCA2, SCA3 e SCA6 e controles.
3. Caracterizar e comparar a gravidade e o padrão de danos cerebrais, cerebelares e da medula espinhal em pacientes com ELA-*ATXN2*, ELA, SCA2 e controles usando técnicas de ressonância magnética multimodal.
4. Correlacionar os achados de neuroimagem estrutural do cérebro, cerebelo e medula espinhal com dados clínicos e genéticos de pacientes com ELA-*ATXN2*, SCA2 e controles.
5. Comparar os padrões estruturais de danos cerebrais e cerebelares encontrados em pacientes com ELA-*ATXN2* e SCA2 com um mapa de expressão gênica.

3. MÉTODOS

3.1 Considerações sobre a apresentação dos métodos

Dada a complexidade metodológica deste estudo e o uso de técnicas avançadas de neuroimagem, as descrições detalhadas dos protocolos específicos de aquisição, processamento e análise de dados, bem como casuística específica de cada capítulo serão apresentadas nos artigos científicos derivados desta tese. A presente seção oferece um panorama geral dos métodos empregados, fornecendo a base para a interpretação dos resultados e discussão.

3.2 Casuística

Foram incluídos indivíduos adultos diagnosticados com SCA2, SCA3, SCA6, ELA e ELA-*ATXN2*, com confirmação molecular, dentro das faixas estabelecidas para cada condição.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos indivíduos que preenchiam os seguintes critérios:

3.3.1. Capítulo 1

Grupo SCA2: pacientes com diagnóstico clínico de SCA2 e confirmação molecular da expansão patogênica no gene *ATXN2*.

Grupo SCA3: pacientes com diagnóstico clínico de SCA3 e confirmação molecular da expansão patogênica no gene *ATXN3*.

Grupo SCA6: pacientes com diagnóstico clínico de SCA6 e confirmação molecular da expansão patogênica no gene *CACNA1A*.

Grupo	N	
SCA2	16	SCA2 Vs CTRL
SCA3	26	SCA3 Vs CTRL
SCA6	14	SCA6 Vs CTRL
Controles	56	

FIGURA 2: À esquerda na figura, tabela descrevendo o tamanho amostral de cada grupo do capítulo 1, com 16 pacientes SCA2, 26 pacientes SCA3, 14 pacientes SCA6 e 56 controles e à direita ilustração da organização das análises comparativas entre grupos.

3.3.2. Capítulo 2

Grupo SCA2: pacientes com diagnóstico clínico de SCA2 e confirmação molecular da expansão patogênica no gene *ATXN2*.

Grupo ELA: pacientes com diagnóstico clínico de ELA de acordo com os critérios revisados de El Escorial, associados à ausência de expansão intermediária ou completa (menor que 27 repetições de CAG) no gene *ATXN2*.

Grupo ELA-*ATXN2*: pacientes com diagnóstico clínico de ELA de acordo com os critérios revisados de El Escorial, associados à presença de uma expansão intermediária (27-34 repetições de CAG) no gene *ATXN2*.

Grupo	N	
sELA	15	
ATXN2-ELA	16	
SCA2	17	
Controles	34	

FIGURA 3: À esquerda na figura, tabela descrevendo o tamanho amostral de cada grupo do capítulo 2, com 15 pacientes com ELAe, 16 pacientes com ELA-*ATXN2*, 17 pacientes com SCA2 e 34 controles e à direita ilustração da organização das análises comparativas entre grupos.

Os critérios de exclusão para ambos os capítulos compreenderam:

- Presença de mutações genéticas adicionais associadas a outras doenças do neurônio motor ou ataxias hereditárias.
- Comorbidades neurológicas ou psiquiátricas significativas que pudessem interferir na análise dos dados clínicos e de neuroimagem.

c) Histórico de lesões estruturais cerebrais ou medulares que não fossem atribuíveis à doença de base.

O grupo controle foi composto por indivíduos neurologicamente saudáveis, pareados com demais grupos por idade e sexo, sem variantes patogênicas identificadas no gene *ATXN2*, *ATXN3* ou *CACNA1A* e sem histórico de doenças neurológicas ou psiquiátricas.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da participação, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.4 Avaliação clínica

Todos os participantes foram submetidos a uma avaliação clínica padronizada, incluindo exame neurológico detalhado e aplicação de escalas funcionais específicas para cada condição.

a) Pacientes com SCA2, SCA3 e SCA6 foram avaliados por meio da SARA para quantificação da gravidade dos sintomas atáxicos (149).

b) Pacientes com ELA e ELA-*ATXN2* foram avaliados por meio da ALSFRS-R, que mensura a progressão da doença (150).

c) Foram coletadas informações sobre idade, tempo de doença, histórico familiar, manifestações clínicas associadas e capacidade funcional.

3.5 Métodos de neuroimagem

Os exames de ressonância magnética (RM) foram realizados em equipamentos de super alto campo (3T), Philips Achieva-Intera, com bobinas de 16 canais, utilizando protocolos otimizados para aquisição de imagens do encéfalo e da medula espinhal conforme publicações prévias(25,29,139,151–153). Foram adquiridas as seguintes sequências:

a) Imagem estrutural ponderada em T1 para análise volumétrica do encéfalo e medula cervical.

b) FLAIR e T2 ponderado para detecção de lesões cerebrais diversas que poderiam ser enquadradas como critérios de exclusão, mas também utilizadas para análises volumétricas no capítulo 1.

c) Imagem por tensor de difusão (DTI) para avaliação da integridade microestrutural da substância branca através da análise pós-processamento descrita no item 3.6 e individualmente nos resultados.

3.6 Análise dos dados de neuroimagem

O processamento das imagens foi conduzido utilizando pipelines validados em softwares especializados.

a) Volumetria e morfometria baseada em voxel (VBM) foram realizadas para quantificar atrofia cerebral e do tronco encefálico utilizando Fastsurfer(154) e FreeSurfer(155).

b) Segmentação automatizada da medula espinhal e estruturas cerebelares foi realizada para obtenção de medidas quantitativas, através dos pipelines Spinalcord Toolbox (156) e CerebNet (157).

c) Análises de DTI foram conduzidas para calcular parâmetros como FA e MD, fornecendo dados sobre a integridade microestrutural dos tratos nervosos medulares, também utilizando o Spinalcord Toolbox (156).

Todos os dados foram analisados de forma cega pelos pesquisadores responsáveis, garantindo imparcialidade na interpretação dos resultados.

Para investigar a distribuição fisiológica da expressão do gene *ATXN2* no encéfalo humano e compará-la ao padrão de lesão estrutural identificado em nossa amostra no capítulo 2 desta tese, utilizamos o *Allen Human Brain Atlas* (AHBA). O AHBA é um repositório público que contém dados de seis cérebros de adultos saudáveis sem histórico de doenças neurológicas ou psiquiátricas(158). Em cada cérebro, o RNA mensageiro foi extraído de aproximadamente 900 regiões espacialmente distintas, obtidas por macrodissecção manual ou microdissecção a laser, e quantificado por microarranjos contendo sondas Agilent Whole Human Genome (4 × 44K) e cerca de 16.000 sondas adicionais customizadas. Cada gene possui valores de expressão regionais normalizados em z-scores por cérebro. No caso do *ATXN2*, existem cinco sondas disponíveis na base de dados; adotamos uma abordagem em duas etapas para selecionar aquela mais representativa da distribuição de expressão. Inicialmente, avaliamos a homologia de sequência entre cada sonda e o gene *ATXN2* por meio do pipeline nucleotide BLAST (NCBI), excluindo as sondas com homologia < 100%. Em seguida, entre as sondas remanescentes,

selecionamos aquela com maior estabilidade de expressão. Os valores de expressão em z-score da sonda escolhida foram então projetados em um template de ressonância magnética encefálica segmentado segundo as etiquetas do software FreeSurfer, utilizando software proprietário do laboratório de física médica da UNICAMP conforme publicação prévia(152), abrangendo córtex cerebral, gânglios da base e cerebelo, mas não o tronco encefálico. Como as regiões definidas no AHBA não são diretamente análogas às segmentações do FreeSurfer, seguimos o procedimento metodológico descrito por Rittman et al. para a padronização dessa correspondência(159).

3.7 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas por meio de testes estatísticos apropriados:

- a) Testes t de Student, MANCOVA ou Mann-Whitney foram empregados para variáveis contínuas, conforme a distribuição dos dados.
- b) Teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram utilizados para comparar variáveis categóricas.
- c) Modelos de regressão linear foram aplicados para avaliar a correlação entre medidas de neuroimagem e variáveis clínicas.
- d) Correções para comparações múltiplas, métodos FDR e Bonferroni foram utilizadas quando necessário.

O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$, sendo optada pela correção dos valores de p em caso de ajuste para múltiplas comparações, ao invés de ajuste da significância α .

3.8 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP e conduzido em conformidade com os princípios da Declaração de Helsinque. Todos os participantes receberam informações detalhadas sobre os objetivos do estudo e assinaram o TCLE antes da inclusão no protocolo.

4. RESULTADOS

4.1 Capítulo 1: Neuroimagem medular em SCA2 (artigo)

Este capítulo apresenta o primeiro artigo incluído nesta tese, dentro do modelo alternativo em que os resultados são constituídos pelos artigos publicados. Para facilitar a leitura e a compreensão da lógica que estrutura a tese, este texto introdutório resume de forma sintética os principais achados que serão detalhados no artigo na sequência.

O objetivo deste estudo foi caracterizar anormalidades da medula espinhal em pacientes com SCA2, SCA3 e SCA6, explorando também sua correlação fenotípica, uma área até então pouco investigada.

Foram avaliados 26 pacientes com SCA3, 16 com SCA2 e 14 com SCA6, além de controles saudáveis pareados, por meio de ressonância magnética cervical em aparelho de 3 Tesla, com processamento de imagens pelo Spinal Cord Toolbox. Foram conduzidas análises morfométricas e de difusividade da substância branca.

Os resultados demonstraram atrofia medular significativa e alterações microestruturais em SCA2 e SCA3, mas ausência de anormalidades em SCA6. Em SCA2, observou-se forte correlação negativa entre área transversal da medula e tempo de doença, sugerindo potencial valor biomarcador desse achado para monitorar progressão. O estudo reforça a relevância da imagem medular para compreender a fisiopatologia das SCAs e aponta a utilidade de métricas derivadas da RM como ferramentas promissoras para avaliação clínica e futura aplicação em ensaios terapêuticos.



Tract-specific spinal damage in SCA2, SCA3 and SCA6

Fabício Castro de Borba¹ · Joyce Macedo Sanches Fernandes¹ · Thiago Junqueira Ribeiro de Rezende^{1,2} · Caralis González-Salazar¹ · Lucas de Melo Teixeira Branco¹ · Paulo Schneider Wolmer¹ · José Luiz Pedrosa³ · Orlando Graziani Povoas Barsottini³ · Marcondes Cavalcante França Junior^{1,2}

Received: 18 June 2024 / Revised: 8 October 2024 / Accepted: 9 October 2024 / Published online: 12 December 2024
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2024

Abstract

Background Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a group of neurodegenerative disorders characterized by progressive ataxia. Although previous studies have focused on cerebral and cerebellar damage, spinal cord involvement in SCAs remains underexplored.

Objectives This study aims to characterize spinal cord abnormalities in SCA2, SCA3, and SCA6 and to identify its phenotypic correlates.

Methods We conducted a multimodal spinal neuroimaging study on 26 SCA3, 16 SCA2, and 14 SCA6 patients, along with matched healthy controls. MRI scanning was performed using a 3 Tesla device, and the Spinal Cord Toolbox (SCT) was employed for morphometric and diffusivity analyses of the cervical spinal cord.

Results Our findings revealed significant spinal cord atrophy and altered white matter microstructural metrics in SCA3 and SCA2 patients compared to controls, with no abnormalities in SCA6. A strong negative correlation was observed between cross-sectional cord area and disease duration in SCA2, suggesting its potential as a biomarker for disease progression.

Conclusions This study highlights the importance of spinal cord imaging in understanding the pathophysiology of SCAs and demonstrates the utility of MRI-based metrics in identifying structural deviations and their clinical correlates. Further longitudinal studies are needed to validate these findings and explore their implications for clinical trials and therapeutic interventions.

Keywords Spinocerebellar ataxia · SCA2 · SCA3 · SCA6 · MRI · Spinal cord toolbox

Introduction

Spinocerebellar ataxias (SCAs) encompass a diverse group of autosomal dominant neurodegenerative disorders, primarily characterized by cerebellar motor syndrome. SCA2, SCA3, and SCA6 are some of the most prevalent genotypes, resulting from CAG repeat expansions in the *ATXN2*, *ATXN3*, and *CACNA1A* genes, respectively [1–3]. While progressive ataxia is a common clinical manifestation across these SCAs, each type also presents distinct clinical and neuropathological features [4].

SCA2 is distinguished by its extensive cerebral and cerebellar atrophy, more pronounced than in other SCAs, with significant olivopontocerebellar atrophy [3, 5]. SCA3, known as the most frequent SCA globally, is typically marked by significant striatal and cerebellar atrophy, as observed in neuropathological studies [6]. In contrast, SCA6 is characterized by more localized cerebellar atrophy, a later

Fabício Castro de Borba and Joyce Macedo Sanches Fernandes share first authorship of the paper.

✉ Marcondes Cavalcante França Junior
 mcfrj@unicamp.br

¹ Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Departamento de Neurologia da FCM/UNICAMP, Department of Neurology, Universidade Estadual de Campinas, University of Campinas, Cidade Universitária s/n Caixa Postal, 6111 Barão Geraldo, 13083970 Campinas, SP, Brazil

² Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology (BRAINN), São Paulo, Brazil

³ Department of Neurology and Neurosurgery, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

onset of ataxia symptoms, and a comparatively slower progression [7].

Neuroimaging research in the context of SCAs has predominantly focused on cerebral and cerebellar damage. However, recent insights have highlighted the spinal cord as a critical element in the pathogenesis of these disorders [8]. Previous MRI papers in SCAs have not studied in-depth tract-specific spinal damage patterns, and apart from the recent multicenter ENIGMA-ataxia morphometric study, no papers analyzed spinal cord MRI of SCA2 patients. The extent and progression of spinal cord damage in SCAs, including in pre-ataxic stages, remain largely unexplored.

Addressing these gaps is essential not only for a deeper understanding of SCA pathophysiology but also for identifying potential sensitive imaging biomarkers for upcoming clinical trials.

The introduction of specialized tools, such as the Spinal Cord Toolbox (SCT), offers a promising avenue to explore this neglected domain. In this investigation, we aim to discern potential spinal cord anomalies linked to SCA2, SCA3 and SCA6. Our goal is to pinpoint structural deviations that might shed light on the disease's underlying mechanisms, help define genotype-specific findings and its clinical correlates.

Methods

Study population

We enrolled 56 individuals with molecular confirmation of spinocerebellar ataxia, including 26 SCA3, 16 SCA2 and 14 SCA6 and respectively 20, 16 and 14 healthy controls (HCs) approximately matched by gender and age. Ethics Committee of Clinics Hospital at University of Campinas approved the study protocol (registered as “CAAE 29869520.8.3001.5404”). Informed consent was signed by all participants. Patients with previous encephalic pathology, neurologic comorbidities, imaging showing excessive motion artifacts and medical devices incompatible with high-field MR imaging were excluded.

Functional and clinical evaluation

Standardized clinical evaluation paired with neuroimaging was performed in all patients, including thorough neurologic examination with special focus in ataxia, pyramidal signs, dystonia, Parkinsonism, peripheral neuropathy signs and oculomotor findings. Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA) [9] was the functional measure of choice for all patients.

MRI acquisition

MRI scanning of all subjects was performed on a 3 Tesla (T) Achieva-Intera PHILIPS device (Eindhoven, Netherlands) with a 16-channel head coil (neurovascular). Routine axial and sagittal T1 plus T2 acquisitions were obtained. The former was applied to assess incidental findings. The subsequent advanced spinal cord sequences were obtained:

1. 3D gradient-echo T2-weighted imaging (TR/TE 3500/120 ms, averages: 1, flip angle: 90 degrees, voxel size: $0.8 \times 0.8 \times 0.8$ mm³, field of view [FOV] $256 \times 256 \times 50$ mm³, band-width 389.4 Hz/Px, phase encoding direction: A > > P)
2. Diffusion weighted imaging (DWI) (TR/TE 3429/70 ms, averages: 1, flip angle 90 degrees, FOV $65 \times 64 \times 15$ mm³, voxel size $0.88 \times 0.88 \times 5.0$ mm³, 32 gradient directions, no averages, single shell with max $b = 800$ s/mm², number of b0 images = 1, acquisition mode: “Cartesian”, phase encoding direction A > > P).

This protocol follows parameters suggested by the SCT group (20). The first sequence was used for morphometric analyses, whereas the latter was used for DTI analysis. SCT v.5.7.0 was employed for DTI and morphometry analyses. SCT is a validated automatic atlas-based package that enables quantitative analyses of spinal MRI data.

MRI processing and analyses

T2-weighted Cervical spinal cord images: In order to determine the total cross-sectional area (CSA), a deep-learning tool was employed for the automatic delineation of the spinal cord [10–13]. Prior to establishing vertebral levels, each segmentation underwent a visual check and was adjusted manually when needed (Fig. 1). Subsequently, the subject's image was aligned with the PAM50 template through both linear and nonlinear methods [14]. Following this, the template was adapted to fit the subject's image, enabling the calculation of average CSAs. Corrections for spinal curvature were applied to all CSA measurements, taking into account the angle between the section and the spinal cord's central axis.

Cervical spinal cord DWI/DTI: In our research, based on pathological [1, 15], previous imaging studies [8] and clinical correlations of spinocerebellar ataxias [1, 2, 4, 16], we examined microstructural impairments within four white matter (WM) pathways: the cuneate fasciculus, gracile fasciculus, lateral corticospinal tract (CST), and the anterior spinocerebellar tract. This was achieved by

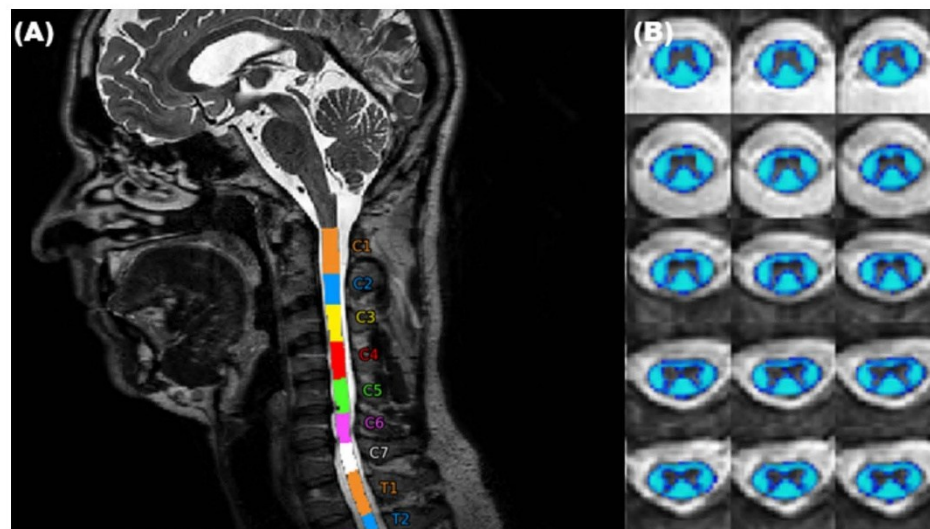


Fig. 1 **A** Sagittal segmentation of the spinal cord from the C1 to T1 levels. **B** Illustrative T2-weighted axial images of spinal cord segmentation at various levels (multiple slices from C1 to C7)

correcting for participant movement in diffusion-weighted imaging (DWI) datasets and subsequently delineating the spinal cord with a deep-learning methodology [13, 17]. We registered the participant's DWI images to the PAM50 standard template and adjusted this to the subject's image to isolate the spinal cord tracts at each vertebral level [14, 18]. The final step involved calculating diffusion metrics, including fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD) and radial diffusivity (RD), for the tracts in question [19]. These metrics were individually determined for each vertebral segment from C2 to C5 on both the left and right sides (Fig. 2).

Statistical analyses

The Kolmogorov–Smirnov test indicated a significant presence of nonparametric variables within our study. As a result, the Mann–Whitney *U* test was employed to evaluate differences between groups, prior to adjusting for age and sex influences through linear regression for all parameters examined. Correlation analyses between MRI outcomes and clinical metrics were performed applying Pearson's test. Addressing the issue of multiple comparisons across all analyses, Bonferroni correction was applied with a significance threshold set at $\alpha=0.05$.

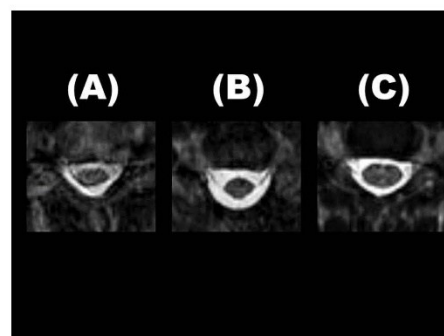


Fig. 2 Illustrative T2-weighted axial images of SCA2 (A), SCA3 (B), and healthy control (C), demonstrating spinal atrophy

Additionally, we calculated the effect size using Cohen's *d* method [20] for each MRI parameter that showed significant differences after group comparison. The effect size was categorized as small for values of 0.2, moderate for 0.5, large for 0.8, and very large for values exceeding 1.2.

Data availability

Data available upon request due to ethical and patient privacy restrictions.

Results

Clinical data

Demographic and general clinical data with group descriptive statistics are displayed in Table 1. From the SCA3 cohort, 3 patients had dystonia (11.5%), none showed parkinsonism and 15 had peripheral neuropathy (57.6%). The most common additional clinical finding in SCA2 patients was ocular motor deficits (50%), and only one patient showed lower motor neuron signs, mainly represented as

distal amyotrophy and generalized areflexia (6.25%). All SCA6 patients had pure cerebellar ataxia, without any other neurological evidence of multisystemic disease.

MRI group analysis: SCA3 versus healthy controls

The spinal cross-sectional area (CSA) of SCA3 patients was significantly smaller ($p < 0.001$) than controls in all vertebral segments studied (from C1 to T2) with a very large effect size (> 1.2). CSA detailed results are available in Table 2. Eccentricity was increased ($p = 0.044$) in C5 compared to controls (0.83).

DTI analyses revealed decreased fractional anisotropy (FA) in SCA3 patients compared to controls from C2 to C5 bilaterally in fasciculus gracilis (p -values < 0.001), fasciculus cuneatus (p -values < 0.001) and lateral corticospinal tract (p -values < 0.001) with a very large effect size. Ventral

Table 1 Clinical data and descriptive statistics (MEAN $\pm$ SD; Min–Max)

Features	SCA patients	Controls	<i>p</i> -value
SCA3	<i>n</i> = 26	<i>n</i> = 26	
Age at MRI (years)	48.58 $\pm$ 12.00; (17–72)	50.58 $\pm$ 12.02; (18–68)	0.69
Sex (M: F)	12:14	12:8	–
Disease onset (years)	40.09 $\pm$ 11.71; (6–66)	N/a	–
Disease duration at MRI (years)	9.02 $\pm$ 6.73; (1–23)	N/a	–
SARA at MRI	9.42 $\pm$ 7.51; (1–25)	N/a	–
CAG Repeats	71.04 $\pm$ 3.71; (66–85)	N/a	–
SCA2	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 16	
Age at MRI (years)	42.75 $\pm$ 18.15; (18–70)	43.53 $\pm$ 16.42; (18–72)	0.89
Sex (M: F)	1:1	1:1	–
Disease onset (years)	32.88 $\pm$ 15.84; (7–70)	N/a	–
Disease duration at MRI (years)	9.50 $\pm$ 6.57; (2–25)	N/a	–
SARA at MRI	14.56 $\pm$ 9.34; (1–31.5)	N/a	–
CAG Repeats	41.26 $\pm$ 6.25	N/a	–
SCA6	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 14	
Age at MRI (years)	66.36 $\pm$ 9.3; (54–84)	61.40 $\pm$ 8.8; (47–76)	0.45
Sex (M: F)	9:5	5:9	–
Disease onset (years)	51.00 $\pm$ 9.41; (39–65)	N/a	–
Disease duration at MRI (years)	15.56 $\pm$ 6.88; (6–30)	N/a	–
SARA at MRI	13.82 $\pm$ 7.20 (4.5–25)	N/a	–
CAG Repeats	Unavailable	N/a	–

N/a non-applicable, M:F male-to-female, Min minimum, Max maximum

Table 2 CSA group analysis

Segment	Patients	Controls	Adj. <i>p</i> -value	Effect-size
SCA3	<i>n</i> =26	<i>n</i> =26		
T2	27.26 ± 5.30	38.12 ± 4.87	< 0.001	2.13
T1	31.04 ± 5.55	43.86 ± 5.91	< 0.001	2.28
C7	38.75 ± 7.03	55.85 ± 9.07	< 0.001	2.14
C6	48.56 ± 8.19	68.83 ± 9.79	< 0.001	2.27
C5	56.02 ± 8.09	76.87 ± 9.78	< 0.001	2.33
C4	59.70 ± 8.21	79.46 ± 9.83	< 0.001	2.20
C3	57.67 ± 7.82	74.94 ± 9.73	< 0.001	1.97
C2	56.88 ± 7.01	73.01 ± 9.75	< 0.001	1.92
C1	59.46 ± 6.68	75.77 ± 8.57	< 0.001	2.15
SCA2	<i>n</i> =16	<i>n</i> =16		
T2	22.40 ± 5.41	37.56 ± 6.42	< 0.001	2.54
T1	25.41 ± 5.92	42.76 ± 6.82	< 0.001	2.71
C7	31.87 ± 8.09	52.08 ± 10.38	< 0.001	2.17
C6	40.04 ± 10.04	64.96 ± 11.47	< 0.001	2.31
C5	47.16 ± 9.42	74.33 ± 11.33	< 0.001	2.61
C4	49.20 ± 9.56	79.08 ± 10.28	< 0.001	3.01
C3	47.47 ± 8.97	75.18 ± 10.46	< 0.001	2.84
C2	47.01 ± 8.73	72.95 ± 9.85	< 0.001	2.79
C1	46.94 ± 8.75	73.78 ± 7.47	< 0.001	3.30
SCA6	<i>n</i> =14	<i>n</i> =14		
T2	35.10 ± 2.84	36.63 ± 3.38	0.86	–
T1	38.04 ± 2.96	40.55 ± 3.95	0.96	–
C7	48.15 ± 5.22	51.11 ± 5.86	0.86	–
C6	62.37 ± 5.72	63.18 ± 7.77	1.00	–
C5	71.09 ± 5.37	69.28 ± 7.37	1.00	–
C4	74.79 ± 5.73	70.59 ± 7.59	1.00	–
C3	67.95 ± 6.73	67.74 ± 7.16	1.00	–
C2	68.57 ± 4.26	67.48 ± 6.58	1.00	–
C1	67.24 ± 5.54	68.12 ± 6.58	1.00	–

Adj. *p*-value Bonferroni adjusted *p*-value

spinocerebellar tract also showed reduced FA for most segments, however when adjusted for multiple comparisons, the difference in left C2 ($p=0.452$) and left C3 ($p=0.095$) lost significance. Mean diffusivity (MD) was increased in left fasciculus gracilis at C4 ($p=0.002$), C2 ($p=0.046$), right fasciculus gracilis C5 ($p=0.05$) and C4 ($p=0.018$), left fasciculus cuneatus at C5 ($p=0.01$), C3 ($p=0.015$) and C2 ($p=0.026$), right fasciculus cuneatus at C4 ($p=0.001$) and right lateral corticospinal tract at C4 ($p=0.002$). Spinocerebellar tracts MD and radial diffusivity (RD) did not differ from controls. RD was significantly increased in comparison to healthy controls in left fasciculus gracilis C5 ($p=0.038$), C4 ($p=0.003$) and C2 ($p=0.011$), right fasciculus gracilis C5 ($p=0.022$) and C4 ($p=0.014$), left fasciculus cuneatus C5 ($p=0.02$), C3 ($p=0.003$) and C2 ($p=0.004$), right fasciculus cuneatus C4 ($p=0.002$) and C3 ($p=0.018$), left lateral corticospinal tract C4 ($p=0.018$), right lateral corticospinal tract C5 ($p=0.024$)

and C4 ($p=0.004$). Spinal axial diffusivity (AD) was preserved in all segments and tracts studied.

MRI group analysis: SCA2 versus healthy controls

Spinal CSA of SCA2 patients was smaller ($p<0.001$) with very large effect size compared to controls across C1 to T2 with a very large effect size (Table 2). Eccentricity did not differ from controls. DTI results showed decreased FA (Fig. 3) in fasciculus cuneatus from C2 to C5 bilaterally, fasciculus gracilis C5, C4 and C3 bilaterally, left lateral corticospinal tract at C3 ($p=0.039$), bilateral ventral spinocerebellar tracts at C5, C4 and C3. SCA2 patients also displayed increased MD in fasciculus gracilis bilaterally at C5 ($p=0.08$ left, $p=0.003$ right) and right C3 ($p=0.034$), left fasciculus cuneatus at C5 ($p=0.005$), right fasciculus cuneatus C5 ($p=0.01$) and C3 ($p=0.007$), right ventral spinocerebellar tract at C5 ($p=0.005$). Lateral corticospinal tract MD showed no differences from controls. RD was increased in SCA2 patients in left fasciculus gracilis C5 ($p=0.002$), right fasciculus gracilis C5 ($p=0.001$) and C3 ($p<0.001$), left fasciculus cuneatus C5 ($p<0.001$), C3 ($p=0.001$) and C2 ($p=0.032$), right fasciculus cuneatus C5 ($p=0.002$) and C3 ($p<0.001$), right ventral spinocerebellar tract C5 ($p=0.004$). Corticospinal tracts RD was not different from controls. AD findings were unremarkable for all tracts in all spinal levels.

MRI group analysis: SCA6 versus healthy controls

In comparison to healthy controls, SCA6 patients spinal CSA, eccentricity and all DTI parameters studied showed no significant differences.

Correlation analyses: SCA2

Correlation analysis revealed a strong negative correlation ($r=-0.745$) between T2 spinal CSA and disease duration ($p=0.013$). DTI findings did not correlate with any clinical features studied.

Correlation analyses: SCA3

Left fasciculus cuneatus C3 RD was directly correlated to SARA ($r=0.704$, $p=0.021$), and the scatterplot is displayed as Fig. 4. No other correlations were found between MRI findings and clinical results.

Discussion

This study aimed to elucidate the extent and patterns of spinal cord damage in patients with SCA2, SCA3, and SCA6, employing advanced neuroimaging techniques [8,

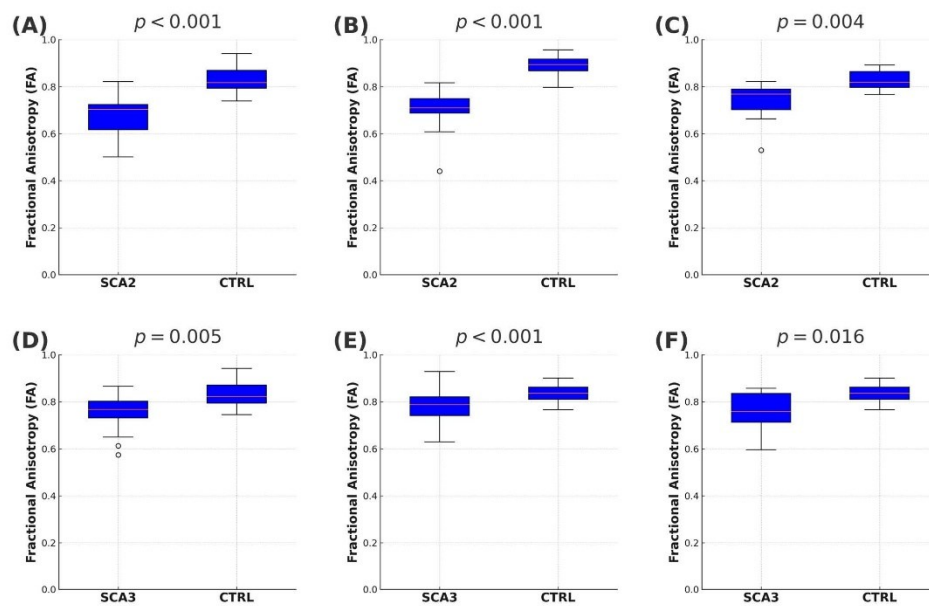
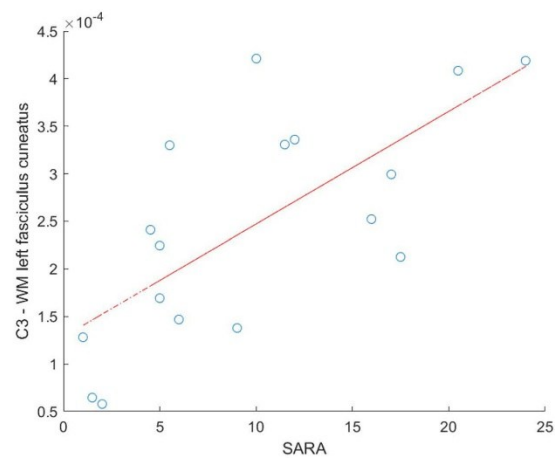


Fig. 3 Boxplots showing the distribution of FA values in patients with SCAs and respective controls for specific white matter tracts at C3 level. SCA2: fasciculus gracilis (A), fasciculus cuneatus (B)

and corticospinal tract (C); SCA3: fasciculus gracilis (D), fasciculus cuneatus (E) and corticospinal tract (F)

Fig. 4 Scatter plot demonstrating positive correlation between SARA and radial diffusivity in C3 left fasciculus cuneatus ($r=0.704$, $p=0.021$)



10, 12–14, 17, 18]. In a recent publication based on data from the ENIGMA-Ataxia consortium [8], we were able to characterize the morphometric changes taking place in each of these SCAs. Herein, we took a step forward since tract-specific diffusivity analyses were accomplished, giving insights into microstructural changes taking place in SCA2, SCA3 and SCA6. Taken together, our findings reveal distinct (micro)structural signatures associated with each SCA subtype, underscoring the heterogeneity of spinal cord involvement in these disorders.

SCA2 patients demonstrated significant spinal CSA reduction and altered diffusion tensor imaging (DTI) metrics, particularly in the fasciculi cuneatus and gracilis, which are implicated in proprioceptive signal transmission. These findings align with neuropathological studies showing extensive spinal cord degeneration in SCA2, including atrophy of the dorsal columns and spinocerebellar tracts [16, 21]. The strong negative correlation between spinal CSA (at upper thoracic levels) and disease duration suggests the progressive nature of spinal cord involvement and underscore its potential as a biomarker to track disease progression. DTI metrics, specifically AD and RD maps, provide valuable insights on white matter damage. AD reflects diffusivity along the primary direction of diffusion and serves as a surrogate indicator of axonal damage [22]. In contrast, RD measures diffusion perpendicular to the main direction and has been associated to myelin/oligodendrocyte damage [23]. In SCA2 patients, we observed increased AD and RD, suggesting the presence of both axonal damage and demyelination, offering insights into the underlying neuropathology.

Previous work from our group revealed MRI evidence of cervical spinal cord atrophy in SCA3 patients [24]. The current study extends these findings by demonstrating not only atrophy but also significant changes in white matter microstructural metrics. In SCA3 patients, we observed significant spinal CSA reduction and decreased FA in multiple white matter tracts, indicating widespread spinal cord atrophy and microstructural damage. This aligns with neuropathological findings showing degeneration of the Clarke's column, anterior horns, and various long tracts of the spinal cord in SCA3 patients [16, 21, 25]. The correlation between left fasciculus cuneatus C3 RD and SARA scores in SCA3 further supports the clinical relevance of these imaging findings, with alterations in DTI metrics indicating both axonal and myelin-related damage [22, 23]. This highlights the potential role of spinal cord imaging as a biomarker for SCA3 severity and progression.

Curiously, our findings reveal that MRI metrics correlate with disease duration in SCA2 but not with disease severity, as measured by the SARA scale, while in SCA3 the opposite trend was observed. This difference could be attributed to the distinct pathophysiological mechanisms underlying these subtypes. In SCA2, spinal cord damage appears to progress

in parallel with disease duration, suggesting that spinal degeneration plays a central role in disease progression. However, the SARA scale may not fully capture the clinical impact of spinal cord involvement in this subtype, which may explain the lack of correlation between MRI metrics and disease severity. In contrast, in SCA3, it is possible that spinal cord damage contributes less to the overall clinical presentation, or that the SARA scale reflects predominantly supratentorial and cerebellar degeneration, leading to the observed correlation with severity but not duration.

SCA6 patients did not exhibit significant differences in spinal CSA or DTI parameters compared to healthy controls, reflecting the predominantly cerebellar nature of the disease. This aligns with the clinical phenotype of isolated ataxia, milder course and slower progression compared to SCA2 and SCA3 [1, 2, 16]. The absence of spinal cord abnormalities in SCA6 suggests a localized pathological process, distinguishing it from other SCAs and underscoring the potential of spinal cord MRI as a differential diagnostic tool. This supports the development of an imaging-based diagnostic algorithm, where the absence of spinal cord abnormalities can suggest SCA6 in cases of autosomal dominant cerebellar ataxia.

We have shown that spinal cord abnormalities are a frequent counterpart in some polyglutamine SCAs, but the phenotypic correlates of such damage still need investigation. The straightforward hypothesis is that pyramidal signs and sensory deficits are the primary clinical manifestations related to spinal cord involvement in SCA2, and SCA3 [8]. This assumption is indeed supported by neurophysiological studies, which have found abnormal somatosensory-evoked potentials in patients with SCA2, and SCA3 [26]. In our study, SARA scores were used to quantify disease severity, but detailed sensory testing or evaluation of pyramidal signs were not performed in all cases. This is a limitation that should be addressed in future studies looking at SCA-related spinal cord damage.

Our study emphasizes the importance of spinal cord imaging in understanding the pathophysiology of SCAs. The distinct patterns of spinal cord involvement observed in SCA2 and SCA3, compared to the absence of such changes in SCA6, highlight the potential of spinal cord MRI as a tool for differentiating between SCA subtypes. Furthermore, the correlations between imaging findings and clinical measures underscore the potential of spinal cord DTI as a sensitive biomarker to track disease progression.

Despite original contributions, we should acknowledge some limitations in this study. First, sample sizes were not big for all SCA subtypes, which may have turned the study underpowered to detect potential clinical correlates of spinal cord abnormalities. In addition, paired somatosensory evoked potentials and motor evoked potentials data were not available for most participants, precluding us to perform a

correlation analysis between neurophysiological parameters and spinal cord measurements. So, longitudinal studies with larger and better characterized cohorts are warranted to further elucidate the temporal evolution of spinal cord damage in SCAs and its relationship with clinical/neurophysiological parameters.

In conclusion, our study provides novel insights into the spinal cord pathology of SCAs, with potential implications for diagnosis, prognosis, and future therapeutic interventions. SCA2 and SCA3, but not SCA6 are characterized by extensive macro and microstructural spinal cord abnormalities.

Acknowledgements We express our gratitude towards the generosity and readiness of both our patients and volunteer participants for their invaluable contributions to scientific advancement.

Funding This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants 2019/24240–7 and 2013/07559–3.

Declarations

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval Ethics Committee of Clinics Hospital at University of Campinas approved the study protocol (registered as “CAAE 29869520.8.3001.5404”). The Study was performed compliant to the Declaration of Helsinki.

References

- Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H (2019) Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol* 266:533–544. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9076-4>
- Paulson HL (2009) The spinocerebellar ataxias. *J Neuroophthalmol* 29:227–237. <https://doi.org/10.1097/WNO.0b013e3181b416de>
- Antenora A, Rinaldi C, Roca A et al (2017) The multiple faces of spinocerebellar ataxia type 2. *Ann Clin Transl Neurol* 4:687–695
- Klockgether T (2008) The clinical diagnosis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias. *The Cerebellum* 7:101–105. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0023-2>
- Della NR, Ginestroni A, Tessa C et al (2008) Brain white matter damage in SCA1 and SCA2. An in vivo study using voxel-based morphometry, histogram analysis of mean diffusivity and tract-based spatial statistics. *Neuroimage* 43:10–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.06.036>
- Riess O, Rüb U, Pastore A et al (2008) SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7:125–137. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0013-4>
- Ishikawa K, Watanabe M, Yoshizawa K et al (1999) Clinical, neuropathological, and molecular study in two families with spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67:86–89
- Junqueira T, Rezende R, Adanyaguh I et al (2024) Genotype-specific spinal cord damage in spinocerebellar ataxias: an ENIGMA-Ataxia study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2023-332696>
- Braga-Neto P, Godeiro-Junior C, Dutra LA et al (2010) Translation and validation into Brazilian version of the scale of the assessment and rating of ataxia (SARA). *Arq Neuropsiquiatr* 68:228–230. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2010000200014>
- Cohen-Adad J, Alonso-Ortiz E, Abramovic M et al (2021) Generic acquisition protocol for quantitative MRI of the spinal cord. *Nat Protoc* 16:4611–4632. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00588-0>
- Ullmann E, Pelletier Paquette JF, Thong WE, Cohen-Adad J (2014) Automatic labeling of vertebral levels using a robust template-based approach. *Int J Biomed Imaging*. <https://doi.org/10.1155/2014/719520>
- Gros C, De Leener B, Badji A et al (2019) Automatic segmentation of the spinal cord and intramedullary multiple sclerosis lesions with convolutional neural networks. *Neuroimage* 184:901–915. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.09.081>
- De Leener B, Taso M, Cohen-Adad J, Callot V (2016) Segmentation of the human spinal cord. *MAGMA* 29:125–153. <https://doi.org/10.1007/s10334-015-0507-2>
- De Leener B, Fonov VS, Collins DL et al (2018) PAM50: unbiased multimodal template of the brainstem and spinal cord aligned with the ICBM152 space. *Neuroimage* 165:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.10.041>
- Seidel K, Siswanto S, Brunt ERP et al (2012) Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol* 124:1–21. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1000-x>
- Rüb U, Schöls L, Paulson H et al (2013) Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol* 104:38–66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.01.001>
- Xu J, Shimony JS, Klawiter EC et al (2013) Improved in vivo diffusion tensor imaging of human cervical spinal cord. *Neuroimage* 67:64. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.11.014>
- De Leener B, Lévy S, Dupont SM et al (2017) SCT: spinal cord toolbox, an open-source software for processing spinal cord MRI data. *Neuroimage* 145:24–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.10.009>
- Chang LC, Jones DK, Pierpaoli C (2005) RESTORE: robust estimation of tensors by outlier rejection. *Magn Reson Med* 53:1088–1095. <https://doi.org/10.1002/mrm.20426>
- Lakens D (2013) Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863/ABSTRACT>
- Rüb U, Seidel K, Özerden I et al (2007) 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 Res Rev* 53:235–249. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.003>
- Song SK, Sun SW, Ju WK et al (2003) Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *Neuroimage* 20:1714–1722. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.07.005>
- Song SK, Yoshino J, Le TQ et al (2005) Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 26:132–140. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.01.028>
- Fahl CN, Branco LMT, Bergamo FPG et al (2015) Spinal cord damage in Machado-Joseph disease. *Cerebellum* 14:128–132. <https://doi.org/10.1007/s12311-014-0619-7>

25. Koeppe AH (2018) The neuropathology of spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Adv Exp Med Biol* 1049:233–241. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_11
26. Abele M, Bürk K, Andres F et al (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. Nerve conduction and evoked potential studies in families with SCA1, SCA2 and SCA3. *Brain* 120(12):2141–2148. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/120.12.2141>

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

4.2 Capítulo 2: Neuroimagem multimodal em SCA2, ELA e ELA-ATXN2 (Artigo)

Seguindo a formatação do formato alternativo da tese, o estudo do capítulo 2 teve como objetivo caracterizar e comparar os padrões radiológicos distintivos da ELA-ATXN2, da SCA2, da ELAe e de controles saudáveis, utilizando técnicas quantitativas de neuroimagem computacional. Para isso, foram segmentadas regiões corticais, subcorticais, tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal a partir de imagens ponderadas em T1, com estimativa volumétrica e correlação com mapas de expressão cerebral do gene *ATXN2* oriundos do Allen Human Brain Atlas.

Os resultados mostraram que cada condição apresenta assinatura estrutural específica: na ELAe, o acometimento restringe-se ao giro pré-central; na ELA-ATXN2, predominam alterações no tronco encefálico e na medula espinhal; e na SCA2 observa-se um padrão difuso, com envolvimento de estruturas subcorticais. Além disso, a expressão encefálica de *ATXN2* correlacionou-se com o padrão estrutural da SCA2, mas não com o da ELA-ATXN2. Tais achados reforçam a heterogeneidade dos mecanismos de neurodegeneração mediados pelo *ATXN2*, distinguindo SCA2, ELA-ATXN2 e ELAe tanto em nível clínico quanto radiológico, com implicações relevantes para a compreensão fisiopatológica e para a prática clínica.



Distinct patterns of cerebral and spinal pathology along the spectrum of *ATXN2*-related disorders

Paulo Schneider Wolmer¹ · Fabrício Castro de Borba¹ · Thiago Junqueira Ribeiro de Rezende^{1,2} · Carelis González-Salazar¹ · José Luiz Pedrosa³ · Orlando Graziani Povoas Barsottini³ · Jana Kleinerova⁴ · Peter Bede^{4,5} · Wilson Marques Jr.⁶ · Marcondes Cavalcante França Jr.^{1,2,7}

Received: 8 February 2025 / Revised: 10 March 2025 / Accepted: 11 March 2025
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2025

Abstract

Background The *ATXN2* gene contains a polymorphic CAG-rich region encoding a polyglutamine tract in ataxin-2. Normal alleles have fewer than 27 CAG repeats, 27–34 repeats pose a risk for ALS (*ATXN2*-ALS), and > 34 repeats cause spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). The striking phenotypic differences between these two *ATXN2*-related conditions are not yet fully understood.

Objective To characterize and compare the distinguishing radiological signatures of *ATXN2*-ALS, SCA2, sporadic ALS (sALS) and healthy controls in vivo using quantitative computational neuroimaging techniques.

Methods Four groups were defined: healthy controls ($n = 34$), sALS ($n = 17$), *ATXN2*-ALS ($n = 16$), and SCA2 ($n = 17$). Cortical, subcortical, brainstem, cerebellar and spinal regions were segmented based on T1-weighted data using validated segmentation tools and their volumes estimated. Group-specific morphometric data were correlated with cerebral *ATXN2* expression maps from the Allen Human Brain Atlas.

Results Study groups were age and sex-matched. sALS, *ATXN2*-ALS and SCA2 have distinct structural CNS signatures, with disease burden restricted to the precentral gyri in the sALS group, to the spinal cord and brainstem in the *ATXN2*-ALS group and more diffusely distributed in the subcortical structures in the SCA2 group. Brain *ATXN2* expression correlated with the structural signature of SCA2, but not with that of *ATXN2*-ALS.

Conclusions Neuroimaging signatures differ in *ATXN2*-ALS and SCA2, indicating distinct mechanisms of *ATXN2*-mediated neurodegeneration. sALS and *ATXN2*-ALS also exhibit distinct patterns of CNS involvement. The unique imaging signatures and clinical profiles along the spectrum of *ATXN2*-related disorders raise important questions regarding the pathophysiology of the disease and have practical clinical ramifications.

Keywords Spinocerebellar ataxia · SCA2 · *ATXN2* · ALS · MRI · Fast Surfer

Paulo Schneider Wolmer and Fabrício Castro de Borba shared first-authorship.

✉ Marcondes Cavalcante França Jr.
mcfjr@unicamp.br

¹ Department of Neurology, University of Campinas, Campinas, Brazil

² Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology (BRAINN), Campinas, Brazil

³ Department of Neurology and Neurosurgery, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Computational Neuroimaging Group, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland

⁵ Department of Neurology, St James's Hospital, Dublin, Ireland

⁶ Department of Neurosciences, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁷ Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Departamento de Neurologia da FCM/UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária s/n Barão Geraldo, Campinas, SP 13083-887, Brazil

Published online: 09 April 2025

Springer

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) are neurodegenerative disorders that both have a significant impact on motor function and quality of life in affected patients, but manifest in distinct clinical phenotypes. ALS is characterized by the progressive degeneration of both upper and lower motor neurons, leading to progressive muscle weakness, atrophy, and eventual respiratory failure [1]. SCA2, on the other hand, primarily affects the cerebellum and brainstem manifesting in progressive ataxia, slow saccadic eye movements, and peripheral neuropathy as the key phenotypic traits [2].

Despite the notable clinical differences, genetic studies have identified a notable overlap between ALS and SCA2 through the *ATXN2* gene, which encodes ataxin-2, a protein involved in RNA processing and cellular stress responses [3]. Expansions of CAG repeats within this gene are known to cause SCA2 when the repeat length exceeds 33 [2]. Interestingly, intermediate-length expansions (27–33 repeats) are a strong genetic risk factor for ALS [4]. This genetic overlap suggests that *ATXN2* might play a critical role in the pathophysiology of both disorders.

The association between intermediate-length CAG repeats in the *ATXN2* gene with ALS was first reported by Elden et al. in 2010, who found that these expansions increase the risk of developing ALS by interacting with other ALS-linked gene products, such as TDP-43 and FUS [4]. Subsequent studies have confirmed these findings across various populations, adding that *ATXN2* has a modulatory effect on the phenotype, whereas intermediate-length expansions modulated ALS survival [5, 6]. The exact mechanisms through which *ATXN2* contributes to neurodegeneration in ALS remain unclear, but it is believed that disruptions in RNA metabolism and protein homeostasis play a crucial etiologic role [3].

In ALS, neuroimaging studies have revealed widespread brain and spinal cord atrophy, particularly in regions associated with motor control [7, 8]. While cerebellar involvement has long been overlooked in ALS, recent studies suggest that the extent and the pattern of atrophy can vary depending on the genetic mutations involved [9–11]. For instance, patients with ALS carrying intermediate-length *ATXN2* expansions did not exhibit significant cerebellar pathology, unlike those with *C9orf72* mutations, who show considerable cerebellar degeneration [9]. These observations highlight the considerable pathological, genetic and clinical heterogeneity of ALS and underscore the need for genotype-specific studies to elucidate disease mechanisms.

The Allen Human Brain Atlas provides a valuable resource for studying gene expression patterns across

different brain regions [12]. By mapping the expression of *ATXN2* in healthy individuals and comparing it with neuroimaging data from patients with ALS and SCA2, researchers can identify potential regions of vulnerability and pathways involved in neurodegeneration. This approach can help elucidate the anatomical and molecular underpinnings of these conditions and guide the development of targeted therapies.

In this study, we aim to comprehensively characterize and contrast the clinical and neuroimaging profiles of ALS patients with intermediate-length CAG expansions in *ATXN2* (*ATXN2*-ALS), sporadic ALS (sALS), SCA2 patients and healthy controls. Utilizing advanced MRI techniques and correlating the findings with *ATXN2* gene expression data from the Allen Human Brain Atlas, we hope to gain insights into the structural changes and genetic interactions underpinning these conditions. The understanding of these mechanisms may aid the development of precision diagnostic tools and ultimately tangible therapeutic strategies for both ALS and SCA2.

Methods

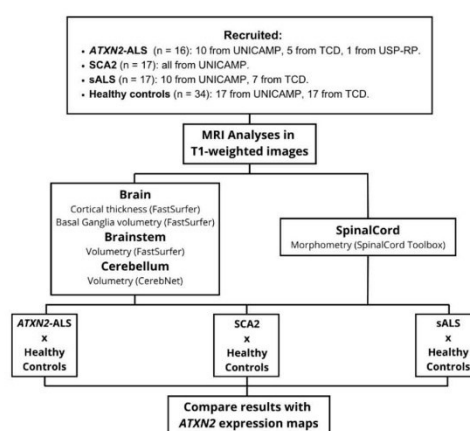
Study population

Seventeen individuals with spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2), 17 sALS patients with non-expanded *ATXN2* CAG repeats (sALS), 16 ALS patients with intermediate-length CAG expansions in *ATXN2* (*ATXN2*-ALS) and 34 healthy controls (HCs) were included, matched for sex and age. Participants were recruited from three centers: the University of Campinas (UNICAMP) in Brazil, the University of São Paulo at Ribeirão Preto (USP-RP) in Brazil and Trinity College Dublin (TCD) in Ireland (Fig. 1). All subjects in the sALS and *ATXN2*-ALS groups were screened and tested negative for pathogenic variants at *C9orf72*, *SOD1*, *ATXN1* and *VAPB* prior to inclusion [13, 14]. None of them had familial history of ALS or other neurodegenerative condition. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinics Hospital at the University of Campinas (registered CAAE 29869520.8.3001.5404). Written informed consent was obtained from all participants. Patients with neurological comorbidities, imaging with excessive motion artifacts, or medical devices incompatible with high-field MRI were excluded.

Clinical evaluation

Core demographic and clinical characteristics were carefully recorded for each participant at the time of MRI scanning including sex, age and symptom duration were obtained. All patients underwent a formal neurological examination, with

Fig. 1 Schematic flowchart of the study (subjects' selection and MRI analyses)



motor, cerebellar and cognitive testing. Motor disability was measured using the Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale revised—ALSF_{RS}-r (for patients with sALS and ATXN2-ALS) and the Scale for assessment and rating of ataxia—SARA (for patients with SCA2) [15, 16].

MRI acquisition

Subjects underwent MRI scanning on a 3 T Philips Achieva platform (Philips, Best, The Netherlands) at all 3 centers. Routine T2-weighted or FLAIR images were obtained to exclude patients with confounding neurovascular, neoplastic or inflammatory abnormalities prior to study inclusion. Before computational processing, all structural images were meticulously reviewed to exclude incidental intracranial pathologies, such as hydrocephalus, developmental abnormalities, etc. A standard eight-channel head coil was used at all three centers for image acquisitions. In this study, we focused on morphometric analyses across groups, and analyzed high-resolution T1-weighted volumetric images of the brain acquired with an isometric voxel size of $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$.

MRI analyses

Separate brain, cerebellum and spinal cord analysis streams were pursued in this research study. We implemented the FastSurfer v.2.0.6 pipeline to assess cerebral cortex thickness and basal ganglia [17, 18]. To segment and estimate brainstem volumes, we used FreeSurfer v 7.4.1 [19, 20]. The cerebellum and the spinal cord were evaluated using the software packages CerebNet

and the SCT (v6.0) toolbox, respectively [19, 20]. Detailed information on each pipeline is provided below.

FastSurfer

To assess cerebral GM structures, we used the FastSurfer software v.2.0.6 [17], which is a deep learning-based solution for structural brain analyses, showing superior performance for high-resolution images compared to the FreeSurfer pipeline [18]. In brief, the brain is parcellated using a convolutional neural network with U-Net architecture and followed by the standard FreeSurfer pipeline [17, 19]. Each subject image is initially corrected for magnetic field inhomogeneity, aligned to standard space (T1airach) and skull stripped [20, 21]. Next, tissue segmentation is performed assigning each voxel as GM, WM, or cerebral spinal fluid. Two surfaces are then created, the pial and white surfaces, using a Gaussian filter with 10-mm full-width half-maximum to smooth both surfaces and enabling the fitting of a triangular mesh over them [20]. Cortical thickness is calculated as the shortest distance between the pial and white surface at each vertex across the cortical layer [19]. Total Intracranial Volume (TIV) is also a measure retrieved from FreeSurfer and later utilized as a normalization factor in the analyses.

FreeSurfer also allows the assessment of specific brainstem volumes, which includes medulla oblongata, pons, midbrain and superior cerebellar peduncle [22]. Such metrics were estimated using the cross-sectional subregion segmentation module within FreeSurfer (v.7.3.2) [23] that relies on a Bayesian probabilistic atlas of the brainstem [22].

CerebNet

For cerebellar volumetry, the CerebNet software [20] v1.0 was used, which is built on the FastSurfer framework [17]. CerebNet is also a deep learning solution dedicated for accurate cerebellar segmentation. Similarly to FastSurfer, it also employs a convolutional neural network with U-Net architecture [24]. This tool was trained using both controls and ataxic individuals, which lead to its superior performance in detecting both gray and white matter boundaries [24].

SCT toolbox

Spinal cord cross-sectional area from C1 to C4 was computed using the open-source pipeline that has been developed within the ENIGMA-Ataxia consortium (<http://enigma.ini.usc.edu/ongoing/enigma-ataxia/>). This is a pipeline based on the Spinal cord Toolbox [25] that performs automatic identification of spinal cord levels, segmentation of spinal cord boundaries and the computation of cross-sectional area adjusted for the curvature of the spine.

Brain expression profile of the *ATXN2* gene

We used the Allen Human Brain Atlas (AHBA) to assess physiologic *ATXN2* expression patterns in the human brain. AHBA is an open repository that contains data derived from six human brains of healthy adults, who had no psychiatric or neurological disease [12]. In each of these brains, messenger RNA (mRNA) was extracted from approximately 900 spatially distinct regions per brain obtained by manual macrodissection or laser-based microdissection and quantified using microarrays containing the 4 × 44 K Agilent Whole Human Genome probes and 16,000 additional custom probes. Each gene has region-specific expression values shown as normalized z-scores per brain. With regard to *ATXN2*, there are 5 probes designed to capture its expression within the AHBA database. Accordingly, we followed a 2-step approach to select the probe that best reflects the brain

expression distribution of this gene. We first looked at the sequence homology of each probe and *ATXN2* (using the nucleotide blast pipeline—<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Whenever the homology was < 100%, we opted to exclude this probe. For the remaining probes, we evaluated the stability expression of each one, and chose that with highest stability [26]. Finally, the z-score expression values for this probe were plotted into a template brain MRI segmented according to the FreeSurfer labels, including the cerebral cortex, basal ganglia and cerebellum, but not the brainstem. As AHBA labels and FreeSurfer labels are not analogous, we followed the procedure proposed by Rittman et al. to overcome this inconsistency [27].

Statistical analyses

Based on Kolmogorov–Smirnov test, variables to be compared across groups had a normal distribution. ANCOVA was used to assess differences in age, sex, head size and site (UNICAMP, USP-RP or TCD) between HCs and each disease group. Correlation analyses between MRI outcomes and clinical metrics were conducted using Pearson coefficients (Supplementary tables 1 and 2). To address the issue of multiple comparisons across all analyses, Bonferroni correction was applied with a significance threshold set at $\alpha = 0.05$. Additionally, we calculated effect sizes (ES) using Cohen's *d* method for each MRI parameter that showed significant differences after group comparison. The ES was categorized as “small” for values of 0.2, “moderate” for 0.5, “large” for 0.8, and “very large” for values exceeding 1.2.

Data availability

Data are available upon reasonable request from the corresponding author.

Table 1 Clinical and demographic data of patients and healthy controls included in the study

Features	sALS (n = 17)	<i>ATXN2</i> -ALS (n = 16)	SCA2 (n = 17)	Healthy controls (n = 34)
Age at MRI (years)	55.59 ± 9.68	57.75 ± 13.86	45.88 ± 20	54.53 ± 12.02
Sex (M:F)	10:07	11:05	10:07	20:14
Age at disease onset (years)	53.94 ± 9.51	54.69 ± 14.48	34.35 ± 18.04	N/a
Symptom duration at MRI (years)	1.18 ± 0.88	2.5 ± 2.31	8.18 ± 6.26	N/a
ALSFRS at MRI	34.76 ± 8.66	30.38 ± 9.21	N/a	N/a
SARA at MRI	N/a	N/a	16.17 ± 11.3	N/a

ALSFRS Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale, SARA Scale for the Assessment and Rating of Ataxia

Results

Cohort profile

Detailed demographic and clinical information is presented in Table 1. In brief, all disease groups are matched for age and sex to the control group ($p > 0.05$). None of the patients in the sALS and *ATXN2*-ALS groups had overt cerebellar signs (either axial or appendicular) on neurological examination. Similarly, none of these patients met diagnostic criteria for comorbid frontotemporal dementia [28].

MRI analyses: between-group comparisons

As outlined in the methods section, all disease groups were compared individually with the healthy control group. The neuroimaging signature in each disease group (SCA2, *ATXN2*-ALS and sALS) was distinct as illustrated in Fig. 2 and Tables 2, 3, 4, 5, 6, 7.

The SCA2 group exhibited anatomically widespread abnormalities relative to controls. Patients with SCA2 had cortical thickness reduction in the paracentral gyrus (2.23 mm vs 2.38 mm, $p = 0.049$), precentral gyrus (2.28 mm vs 2.44 mm, $p = 0.03$) and pars opercularis (2.33 mm vs 2.43 mm, $p = 0.03$) on the left hemisphere; and in the precentral gyrus (2.32 mm vs 2.44 mm, $p = 0.047$) and superior temporal gyrus (2.65 mm vs 2.77 mm, $p = 0.047$) on the right hemisphere. Furthermore, all deep brain nuclei, all cerebellar lobules—except for vermis VII—and the entire brainstem (midbrain, pons and medulla) showed volume reductions. Atrophy also extended to the first four cervical levels of the spinal cord.

Structural abnormalities were more focal in the two ALS groups, but disease-burden pattern was strikingly distinct. In the *ATXN2*-ALS cohort, midbrain (6365.1 mm³ vs 6654.8 mm³, $p = 0.02$), medulla oblongata (4375.8 mm³ vs 4764.9

mm³, $p = 0.005$) and spinal cord (at all four cervical levels) atrophy were observed. No additional findings were detected at the remaining cerebral and cerebellar structures in this study group. In contrast, atrophy among patients with sALS was restricted to the precentral gyri bilaterally (left: 2.29 mm vs 2.44 mm, $p = 0.002$; right: 2.29 mm vs 2.44 mm, $p = 0.01$). In this group, volumes of the basal ganglia, brainstem, cerebellum and spinal cord were unaffected compared to healthy controls.

Clinical correlates of MRI findings

In the sALS group, precentral cortex thickness did not correlate with disease duration or severity in either hemisphere. Conversely, we found that the spinal cord cross-sectional area at C4 and midbrain volume correlated with ALSFRS-r scores in the *ATXN2*-ALS group ($r = 0.42$ and 0.040, respectively). Finally, the volume of multiple cerebellar lobules showed a strong association with ataxia severity in the SCA2 group as measured by SARA scores (supplementary Table 2).

Brain expression of *ATXN2*

Expression signal of *ATXN2* was assessed with the probe A_23_P147439, which had perfect homology with the gene sequence and highest stability among the existing probes. We found widespread gene expression across brain regions. The expression levels were higher at the cerebellar cortices and slightly lower at the cerebral cortices (Fig. 3).

Discussion

CAG repeat expansions within the coding region of *ATXN2* underlie neurodegeneration in the distinct neurodegenerative conditions SCA2 and ALS [29]. In this study, we took a

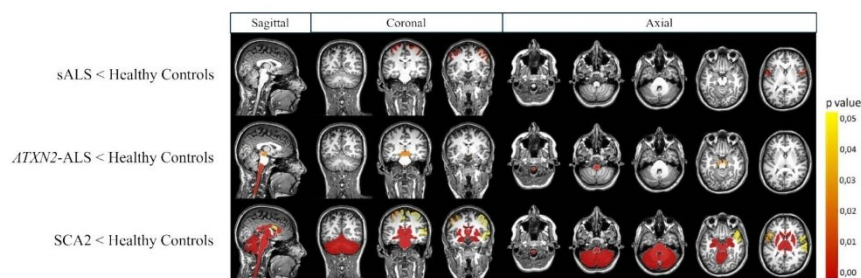


Fig. 2 Central nervous system regions with volumetric reduction in disease-specific groups relative to healthy controls. Upper lane: sporadic ALS. Middle lane: *ATXN2*-ALS. Lower lane: SCA2

Table 2 Right-sided cerebral cortex thickness across groups (results shown in mm² ± SD) and statistical comparisons (Bonferroni-adjusted *p* values and Cohen's *d* values)

Cortical thickness in mm ² ± SD											
Gyri	Sporadic ALS			Healthy controls		Statistics (FDR adjusted <i>p</i> value)					
	Sporadic ALS	ATXN2-ALS	SCA2		Sporadic ALS vs controls		ATXN2-ALS vs controls		SCA2 vs controls		
					Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Adj. <i>p</i> value	Effect-size	
Caudalanteriorcingulate	2.256 ± 0.16	2.248 ± 0.2	2.355 ± 0.24	2.316 ± 0.12	1	—	1	—	1	—	
Caudalmiddlefrontal	2.237 ± 0.16	2.296 ± 0.13	2.209 ± 0.2	2.323 ± 0.12	0.52	—	1	—	0.71	—	
Cuneus	1.743 ± 0.09	1.843 ± 0.12	1.769 ± 0.1	1.773 ± 0.1	1	—	0.8	—	1	—	
Entorhinal	3.160 ± 0.31	3.231 ± 0.38	3.272 ± 0.39	3.285 ± 0.34	1	—	1	—	0.86	—	
Fusiform	2.551 ± 0.137	2.553 ± 0.2	2.558 ± 0.15	2.570 ± 0.1	1	—	1	—	0.86	—	
Inferiorparietal	2.137 ± 0.11	2.237 ± 0.12	2.129 ± 0.12	2.194 ± 0.09	0.77	—	1	—	0.71	—	
Inferotemporal	2.601 ± 0.13	2.647 ± 0.11	2.569 ± 0.12	2.629 ± 0.11	1	—	1	—	0.27	—	
Isthmuscingulate	2.161 ± 0.17	2.155 ± 0.16	2.200 ± 0.15	2.200 ± 0.1	1	—	1	—	1	—	
Lateraloccipital	1.989 ± 0.11	2.047 ± 0.15	1.995 ± 0.07	1.990 ± 0.07	1	—	1	—	1	—	
Lateralorbitofrontal	2.341 ± 0.15	2.463 ± 0.11	2.464 ± 0.07	2.429 ± 0.1	0.48	—	1	—	1	—	
Lingual	1.868 ± 0.11	1.917 ± 0.2	1.946 ± 0.14	1.931 ± 0.11	0.48	—	1	—	1	—	
Medialorbitofrontal	2.270 ± 0.17	2.357 ± 0.17	2.374 ± 0.21	2.346 ± 0.12	0.48	—	1	—	1	—	
Middletemporal	2.616 ± 0.12	2.598 ± 0.14	2.581 ± 0.16	2.631 ± 0.11	1	—	1	—	0.57	—	
Parahippocampal	2.558 ± 0.23	2.67 ± 0.29	2.722 ± 0.28	2.649 ± 0.2	1	—	1	—	1	—	
Paracentral	2.249 ± 0.11	2.267 ± 0.13	2.209 ± 0.16	2.327 ± 0.13	0.48	—	1	—	0.4	—	
Parapeccularis	2.355 ± 0.17	2.415 ± 0.13	2.390 ± 0.16	2.458 ± 0.14	0.48	—	1	—	0.27	—	
Parasorbitalis	2.423 ± 0.17	2.445 ± 0.12	2.504 ± 0.17	2.491 ± 0.15	1	—	1	—	0.86	—	
Parstriangularis	2.207 ± 0.18	2.246 ± 0.14	2.242 ± 0.15	2.281 ± 0.1	0.94	—	1	—	1	—	
Pericalcarine	1.541 ± 0.08	1.593 ± 0.12	1.583 ± 0.12	1.561 ± 0.1	1	—	1	—	1	—	
Postcentral	1.872 ± 0.07	1.937 ± 0.1	1.839 ± 0.11	1.920 ± 0.07	0.48	—	1	—	0.27	—	
Posteriorcingulate	2.301 ± 0.11	2.331 ± 0.16	2.336 ± 0.21	2.322 ± 0.12	1	—	1	—	1	—	
Precuneus	2.286 ± 0.13	2.342 ± 0.13	2.321 ± 0.16	2.437 ± 0.1	< 0.05	1.33	0.8	< 0.05	0.93	—	
Rostralanteriorcingulate	2.188 ± 0.09	2.251 ± 0.11	2.141 ± 0.16	2.218 ± 0.08	1	—	1	—	0.27	—	
Rostralmiddlefrontal	2.562 ± 0.23	2.559 ± 0.16	2.662 ± 0.22	2.589 ± 0.11	1	—	1	—	1	—	
Superiorfrontal	2.100 ± 0.13	2.189 ± 0.13	2.135 ± 0.12	2.174 ± 0.1	0.48	—	1	—	1	—	
Superiorparietal	2.355 ± 0.15	2.400 ± 0.13	2.362 ± 0.15	2.413 ± 0.12	1	—	1	—	1	—	
Superiortemporal	1.910 ± 0.11	2.022 ± 0.12	1.842 ± 0.15	1.934 ± 0.1	1	—	0.8	—	0.66	—	
Supramarginal	2.673 ± 0.21	2.674 ± 0.13	2.652 ± 0.18	2.770 ± 0.12	0.48	—	1	—	< 0.05	0.84	
Transverse temporal	2.263 ± 0.12	2.284 ± 0.12	2.240 ± 0.16	2.311 ± 0.1	1	—	1	—	0.43	—	
Insula	2.157 ± 0.22	2.242 ± 0.25	2.285 ± 0.25	2.354 ± 0.19	0.17	—	1	—	0.54	—	
	2.890 ± 0.18	2.879 ± 0.23	2.910 ± 0.19	2.991 ± 0.11	0.48	—	1	—	0.27	—	

Table 3 Left-sided cerebral cortex thickness across groups (results shown in $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$ and statistical comparisons (Bonferroni-adjusted p values and Cohen's d values)

Gyri	Statistics (FDR adjusted p value)				Statistics (FDR adjusted p value)				Statistics (FDR adjusted p value)			
	Sporadic ALS		Healthy controls		Sporadic ALS vs controls		ATXV2-ALS vs controls		Sporadic ALS vs controls		ATXV2-ALS vs controls	
	Mean	SD	Mean	SD	Adj. p value	Effect-size	Adj. p value	Effect-size	Adj. p value	Effect-size	Adj. p value	Effect-size
Caudal anterior cingulate	2.403 $\pm$ 0.19		2.342 $\pm$ 0.13		2.463 $\pm$ 0.18		2.439 $\pm$ 0.11		1	—	1	—
Caudal middle frontal	2.210 $\pm$ 0.14		2.295 $\pm$ 0.13		2.151 $\pm$ 0.18		2.303 $\pm$ 0.12		0.41	—	0.24	—
Cuneus	1.790 $\pm$ 0.07		1.872 $\pm$ 0.1		1.801 $\pm$ 0.09		1.818 $\pm$ 0.09		1	—	1	—
Entorhinal	3.062 $\pm$ 0.42		3.121 $\pm$ 0.41		3.112 $\pm$ 0.29		3.170 $\pm$ 0.25		1	—	0.75	—
Fusiform	2.538 $\pm$ 0.14		2.566 $\pm$ 0.15		2.556 $\pm$ 0.15		2.553 $\pm$ 0.11		1	—	0.38	—
Inferior parietal	2.197 $\pm$ 0.1		2.263 $\pm$ 0.14		2.160 $\pm$ 0.11		2.225 $\pm$ 0.1		1	—	0.1	—
Inferior temporal	2.602 $\pm$ 0.19		2.638 $\pm$ 0.13		2.570 $\pm$ 0.14		2.593 $\pm$ 0.11		1	—	0.75	—
Isthmus cingulate	2.159 $\pm$ 0.16		2.207 $\pm$ 0.18		2.231 $\pm$ 0.11		2.244 $\pm$ 0.16		0.74	—	1	—
Lateral occipital	1.946 $\pm$ 0.11		2.037 $\pm$ 0.13		1.981 $\pm$ 0.09		1.979 $\pm$ 0.08		1	—	1	—
Lateral orbitofrontal	2.416 $\pm$ 0.15		2.492 $\pm$ 0.14		2.541 $\pm$ 0.13		2.466 $\pm$ 0.11		0.99	—	1	—
Lingual	1.823 $\pm$ 0.11		1.896 $\pm$ 0.14		1.869 $\pm$ 0.13		1.901 $\pm$ 0.11		0.19	—	0.24	—
Medial orbitofrontal	2.212 $\pm$ 0.17		2.276 $\pm$ 0.18		2.378 $\pm$ 0.16		2.324 $\pm$ 0.12		0.2	—	1	—
Middle temporal	2.478 $\pm$ 0.15		2.511 $\pm$ 0.13		2.466 $\pm$ 0.16		2.509 $\pm$ 0.11		1	—	0.15	—
Parahippocampal	2.547 $\pm$ 0.27		2.759 $\pm$ 0.33		2.767 $\pm$ 0.3		2.6867 $\pm$ 0.22		0.55	—	1	—
Paracentral	2.287 $\pm$ 0.11		2.304 $\pm$ 0.12		2.231 $\pm$ 0.18		2.390 $\pm$ 0.13		0.19	—	< 0.05	1.11
Paracuneus	2.350 $\pm$ 0.18		2.401 $\pm$ 0.12		2.333 $\pm$ 0.19		2.430 $\pm$ 0.12		0.6	—	< 0.05	0.67
Parasubicularis	2.475 $\pm$ 0.23		2.472 $\pm$ 0.16		2.540 $\pm$ 0.15		2.503 $\pm$ 0.16		1	—	1	—
Posterior cingulate	1.511 $\pm$ 0.15		1.562 $\pm$ 0.16		1.562 $\pm$ 0.12		1.539 $\pm$ 0.11		0.64	—	0.05	—
Posterior cingulate	1.9001 $\pm$ 0.08		1.957 $\pm$ 0.08		1.870 $\pm$ 0.1		1.948 $\pm$ 0.08		0.52	—	0.16	—
Precentral	2.285 $\pm$ 0.13		2.350 $\pm$ 0.17		2.359 $\pm$ 0.17		2.330 $\pm$ 0.11		1	—	1	—
Precuneus	2.291 $\pm$ 0.1		2.335 $\pm$ 0.16		2.284 $\pm$ 0.17		2.444 $\pm$ 0.11		< 0.05	1.46	< 0.05	1.24
Rostral anterior cingulate	2.455 $\pm$ 0.22		2.487 $\pm$ 0.16		2.603 $\pm$ 0.19		2.563 $\pm$ 0.12		0.52	—	0.29	—
Rostral middle frontal	2.076 $\pm$ 0.13		2.147 $\pm$ 0.1		2.110 $\pm$ 0.12		2.140 $\pm$ 0.11		0.6	—	1	—
Superior frontal	2.276 $\pm$ 0.15		2.370 $\pm$ 0.11		2.310 $\pm$ 0.17		2.380 $\pm$ 0.13		0.4	—	1	—
Superior parietal	1.975 $\pm$ 0.11		2.044 $\pm$ 0.15		1.883 $\pm$ 0.14		1.982 $\pm$ 0.13		1	—	0.75	—
Superior temporal	2.528 $\pm$ 0.19		2.625 $\pm$ 0.19		2.567 $\pm$ 0.2		2.649 $\pm$ 0.12		0.23	—	0.13	—
Supramarginal	2.272 $\pm$ 0.09		2.325 $\pm$ 0.12		2.231 $\pm$ 0.15		2.315 $\pm$ 0.11		1	—	0.24	—
Transverse temporal	2.170 $\pm$ 0.17		2.203 $\pm$ 0.2		2.194 $\pm$ 0.27		2.290 $\pm$ 0.22		0.64	—	0.29	—
Insula	2.875 $\pm$ 0.17		2.860 $\pm$ 0.18		2.907 $\pm$ 0.21		2.974 $\pm$ 0.14		0.52	—	0.28	—

Table 4 Deep nuclei volumetry across groups (results shown in $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$) and statistical comparisons (Bonferroni-adjusted p values and Cohen's d values)

Mean volume in mm ³ ± SD		Statistics (FDR adjusted <i>p</i> value)										
Structures	Sporadic ALS		ATXN2-ALS	SCA2	Healthy controls		Sporadic ALS vs controls		ATXN2-ALS vs controls		SCA2 vs controls	
							Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Adj. <i>p</i> value	Effect-size
L	Thalamus	6843 ± 803	6882 ± 823	5996 ± 923	7433 ± 872	0.13	–	0.06	–	0.06	–	1.62
	Caudate	3344 ± 501	3494 ± 507	2728 ± 392	3494 ± 335	0.57	–	1	–	1	–	2.17
	Putamen	4654 ± 760	4828 ± 518	4048 ± 683	4955 ± 522	0.37	–	0.73	–	0.73	–	1.57
	Pallidum	1901 ± 280	1982 ± 207	1687 ± 259	2076 ± 240	0.17	–	0.13	–	0.13	–	1.58
	Hippocampus	3830 ± 518	3819 ± 612	3564 ± 525	4184 ± 481	0.17	–	0.26	–	0.26	–	1.25
	Amygdala	1676 ± 243	1640 ± 257	1513 ± 232	1812 ± 205	0.21	–	0.2	–	0.2	–	1.41
	Accumbens Area	449 ± 104	494 ± 98	435 ± 82	523 ± 84	0.08	–	1	–	1	–	1.06
	Ventral DC	3963 ± 402	4038 ± 422	3195 ± 526	4250 ± 460	0.17	–	0.06	–	0.06	–	2.19
	Thalamus	6635 ± 635	6560 ± 986	5823 ± 960	7084 ± 781	0.17	–	0.06	–	0.06	–	1.5
	Caudate	3453 ± 539	3672 ± 579	2912 ± 438	3634 ± 357	0.45	–	1	–	1	–	1.88
R	Putamen	4693 ± 723	4850 ± 563	4107 ± 641	4921 ± 507	0.64	–	1	–	1	–	1.47
	Pallidum	1879 ± 243	1971 ± 256	1649 ± 244	2028 ± 211	0.17	–	0.33	–	0.33	–	1.71
	Hippocampus	4033 ± 554	3974 ± 777	3618 ± 525	4344 ± 437	0.21	–	0.39	–	0.39	–	1.56
	Amygdala	1892 ± 205	1837 ± 192	1612 ± 238	1949 ± 212	1	–	0.26	–	0.26	–	1.53
	Accumbens Area	523 ± 95	576 ± 114	491 ± 90	600 ± 99	0.14	–	1	–	1	–	1.14
	Ventral DC	3955 ± 415	4001 ± 456	3161 ± 542	4226 ± 453	0.17	–	0.06	–	0.06	–	2.21
	CC posterior	982 ± 163	975 ± 192	788 ± 114	1060 ± 135	0.45	–	0.26	–	0.26	–	2.1
	CC mid posterior	539 ± 110	506 ± 134	395 ± 94	571 ± 102	1	–	0.33	–	0.33	–	1.77
	CC central	638 ± 206	678 ± 258	518 ± 177	767 ± 638	0.21	–	0.73	–	0.73	–	1.41
	CC mid anterior	584 ± 201	561 ± 275	446 ± 177	624 ± 200	1	–	1	–	1	–	0.92
Central	Anterior	912 ± 200	961 ± 193	817 ± 109	1071 ± 221	0.14	–	0.06	–	0.06	–	1.31

Table 5 Cerebellar volumetry across groups (results shown in $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$) and statistical comparisons (Bonferroni-adjusted p values and Cohen's d values)

Lobules	Mean volume in $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$			Statistics (FDR adjusted p -value)					
	Sporadic ALS			Healthy controls		Sporadic ALS vs controls		ATXN2-ALS vs controls	
	ATXN2-ALS	SCA2	Healthy controls	Adj. p value	Effect-size	Adj. p value	Effect-size	Adj. p value	Effect-size
L	White matter	12,853 $\pm$ 1027	12,773 $\pm$ 1896	6108 $\pm$ 1381	13,293 $\pm$ 1377	1	—	1	—
	Cortex	43,421 $\pm$ 4673	43,215 $\pm$ 7128	25,617 $\pm$ 7071	44,831 $\pm$ 5052	1	—	1	—
	I–IV	2909 $\pm$ 359	2855 $\pm$ 477	1822 $\pm$ 590	3043 $\pm$ 464	1	—	1	—
	V	3023 $\pm$ 606	2973 $\pm$ 562	2228 $\pm$ 449	3039 $\pm$ 416	1	—	1	—
	VI	6457 $\pm$ 895	6283 $\pm$ 1008	3536 $\pm$ 1074	6691 $\pm$ 949	1	—	1	—
	Crus I	10,271 $\pm$ 1321	10,307 $\pm$ 1978	5423 $\pm$ 1964	10,515 $\pm$ 1315	1	—	1	—
	Crus II	6074 $\pm$ 1433	5887 $\pm$ 1384	3605 $\pm$ 1215	6102 $\pm$ 1286	1	—	1	—
	VIIb	4181 $\pm$ 526	4386 $\pm$ 1179	2057 $\pm$ 729	4442 $\pm$ 764	1	—	1	—
	VIIIa	4426 $\pm$ 710	4372 $\pm$ 981	2719 $\pm$ 762	4722 $\pm$ 891	1	—	1	—
	VIIIb	3090 $\pm$ 493	3207 $\pm$ 628	2147 $\pm$ 651	3311 $\pm$ 502	1	—	1	—
	IX	2487 $\pm$ 380	2473 $\pm$ 323	1720 $\pm$ 401	2473 $\pm$ 392	1	—	1	—
	X	503 $\pm$ 60	472 $\pm$ 93	360 $\pm$ 76	494 $\pm$ 78	1	—	1	—
	White matter	12,773 $\pm$ 1066	12,714 $\pm$ 1850	5787 $\pm$ 1478	13,160 $\pm$ 1466	1	—	1	—
	Cortex	43,398 $\pm$ 4676	43,509 $\pm$ 6841	24,904 $\pm$ 7253	44,516 $\pm$ 5243	1	—	1	—
R	I–IV	2820 $\pm$ 378	2855 $\pm$ 542	1705 $\pm$ 562	2994 $\pm$ 469	1	—	1	—
	V	2859 $\pm$ 398	3116 $\pm$ 544	2063 $\pm$ 498	2934 $\pm$ 341	1	—	1	—
	VI	6481 $\pm$ 1103	6326 $\pm$ 951	3780 $\pm$ 1222	6757 $\pm$ 1028	1	—	1	—
	Crus I	10,696 $\pm$ 1346	10,681 $\pm$ 2039	5601 $\pm$ 1627	10,551 $\pm$ 1385	1	—	1	—
	Crus II	6139 $\pm$ 1516	5877 $\pm$ 1584	3317 $\pm$ 1315	6284 $\pm$ 1312	1	—	1	—
	VIIb	4000 $\pm$ 600	4124 $\pm$ 973	2086 $\pm$ 813	4147 $\pm$ 790	1	—	1	—
	VIIIa	4257 $\pm$ 738	4292 $\pm$ 982	2360 $\pm$ 971	4564 $\pm$ 1010	1	—	1	—
	VIIIb	3170 $\pm$ 428	3195 $\pm$ 550	2100 $\pm$ 591	3335 $\pm$ 634	1	—	1	—
	IX	2494 $\pm$ 372	2572 $\pm$ 356	1571 $\pm$ 453	2468 $\pm$ 350	1	—	1	—
	X	482 $\pm$ 96	470 $\pm$ 98	322 $\pm$ 91	481 $\pm$ 83	1	—	1	—
	White matter	12,773 $\pm$ 1066	12,714 $\pm$ 1850	5787 $\pm$ 1478	13,160 $\pm$ 1466	1	—	1	—
	Cortex	43,398 $\pm$ 4676	43,509 $\pm$ 6841	24,904 $\pm$ 7253	44,516 $\pm$ 5243	1	—	1	—
	I–IV	2820 $\pm$ 378	2855 $\pm$ 542	1705 $\pm$ 562	2994 $\pm$ 469	1	—	1	—
	V	2859 $\pm$ 398	3116 $\pm$ 544	2063 $\pm$ 498	2934 $\pm$ 341	1	—	1	—
Central	VI	6481 $\pm$ 1103	6326 $\pm$ 951	3780 $\pm$ 1222	6757 $\pm$ 1028	1	—	1	—
	Crus I	10,696 $\pm$ 1346	10,681 $\pm$ 2039	5601 $\pm$ 1627	10,551 $\pm$ 1385	1	—	1	—
	Crus II	6139 $\pm$ 1516	5877 $\pm$ 1584	3317 $\pm$ 1315	6284 $\pm$ 1312	1	—	1	—
	VIIb	4000 $\pm$ 600	4124 $\pm$ 973	2086 $\pm$ 813	4147 $\pm$ 790	1	—	1	—
	VIIIa	4257 $\pm$ 738	4292 $\pm$ 982	2360 $\pm$ 971	4564 $\pm$ 1010	1	—	1	—
	VIIIb	3170 $\pm$ 428	3195 $\pm$ 550	2100 $\pm$ 591	3335 $\pm$ 634	1	—	1	—
	IX	2494 $\pm$ 372	2572 $\pm$ 356	1571 $\pm$ 453	2468 $\pm$ 350	1	—	1	—
	X	482 $\pm$ 96	470 $\pm$ 98	322 $\pm$ 91	481 $\pm$ 83	1	—	1	—
	White matter	12,773 $\pm$ 1066	12,714 $\pm$ 1850	5787 $\pm$ 1478	13,160 $\pm$ 1466	1	—	1	—
	Cortex	43,398 $\pm$ 4676	43,509 $\pm$ 6841	24,904 $\pm$ 7253	44,516 $\pm$ 5243	1	—	1	—
Vermis	Vermis VI	1368 $\pm$ 301	1455 $\pm$ 171	1082 $\pm$ 188	1429 $\pm$ 231	1	—	1	—
	Vermis VII	614 $\pm$ 142	626 $\pm$ 122	421 $\pm$ 224	593 $\pm$ 131	1	—	1	—
	Vermis VIII	1694 $\pm$ 259	1774 $\pm$ 276	1129 $\pm$ 214	1795 $\pm$ 328	1	—	1	—
	Vermis IX	824 $\pm$ 126	845 $\pm$ 127	592 $\pm$ 115	846 $\pm$ 133	1	—	1	—
	Vermis X	345 $\pm$ 56	345 $\pm$ 46	261 $\pm$ 40	360 $\pm$ 54	1	—	1	—
	White matter	12,773 $\pm$ 1066	12,714 $\pm$ 1850	5787 $\pm$ 1478	13,160 $\pm$ 1466	1	—	1	—

Brainstem group analysis (mean volume in mm³ ± SD)

Table 7 Spinal cord morphometry across groups (results shown in $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$) and statistical comparisons (Bonferroni-adjusted p values and Cohen's d values)

Mean cross-sectional area in mm ² ± SD										
Structures	Sporadic ALS		ATXN2-ALS		SCA2		Healthy controls			
	Statistics (FDR adjusted <i>p</i> value)									
	Sporadic ALS vs controls		ATXN2-ALS vs controls		SCA2 vs controls					
	Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Adj. <i>p</i> value	Effect-size	Effect-size	
C1	62.81 ± 8.52	58.2 ± 10.2	42.46 ± 7.19	67.39 ± 6.76	0.1	–	< 0.05	1.15	< 0.05	3.62
C2	60.26 ± 8.54	56.79 ± 9.95	41.14 ± 7.36	65.64 ± 7.08	0.1	–	< 0.05	1.1	< 0.05	3.42
C3	59.17 ± 7.83	55.79 ± 10.07	41.03 ± 7.47	64.44 ± 7.21	0.1	–	< 0.05	1.05	< 0.05	3.21
C4	59.2 ± 8.87	54.11 ± 10.97	40.63 ± 8.73	64.81 ± 6.69	0.1	–	< 0.05	1.27	< 0.05	3.25

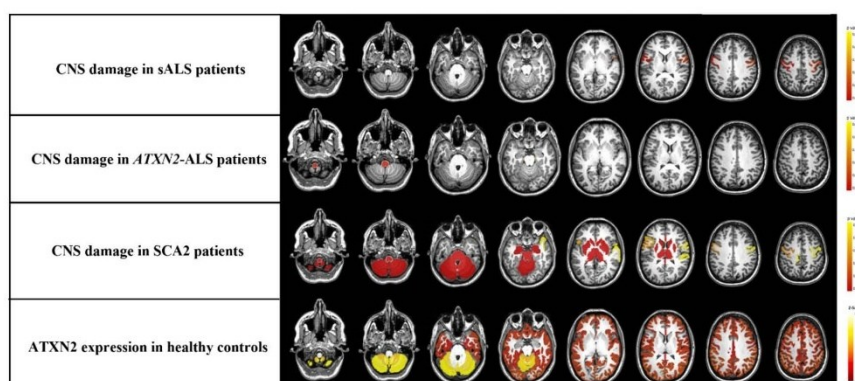


Fig. 3 Brain regions with volumetric reduction in disease-specific groups relative to healthy controls (1 st lane: sporadic ALS. 2nd lane: *ATXN2*-ALS. 3rd lane: SCA2) and Normal pattern of *ATXN2* brain expression (4 th lane)

step forward in understanding the genotype–phenotype correlation in *ATXN2*-related disorders by comparing the structural brain signature in each of these conditions. As expected, based on the distinct clinical phenotype, we identified strikingly different radiological patterns. In line with previous studies, our SCA2 cohort exhibited widespread subcortical pathology, involving the cerebellum, basal ganglia, brainstem and spinal cord [30–32]. Until this study, relatively little was known about the CNS regions affected in *ATXN2*-ALS and these studies were limited by small samples of intermediate-length CAG repeat carriers in *ATXN2* [9, 11]. In this study, we succeeded in recruiting a representative cohort of well-characterized patients with *ATXN2*-ALS to address this question. The brainstem and the spinal cord were key sites of pathological change in this ALS subtype. Taken together, these results suggest that the brainstem and spinal cord are preferentially affected in *ATXN2*-related neurodegeneration, regardless of the expansion size (intermediate or full).

Experimental evidence indicates that SCA2 is caused by polyglutamine expanded ataxin-2 gain of toxic function [33]. In transgenic SCA2 models, *ATXN2* lowering with Antisense oligonucleotides (ASOs) prevented neuronal loss and restored phenotypes [33]. So, it is conceivable that neurons with higher *ATXN2* expression would be more susceptible to neurodegeneration. Our imaging results support this notion since the brain maps of *ATXN2* expression and structural damage are largely overlapping. In contrast, the precise mechanisms underlying motor neuron degeneration in *ATXN2*-ALS are not yet fully explained [4, 34]. Nevertheless, it is rather probable they are (at least in part) distinct from those seen in SCA2. This hypothesis

is in line with pathological data since motor neurons of deceased patients with *ATXN2*-ALS do not present the typical neuronal inclusions seen in SCA2 [4]. Preclinical data suggest that intermediate expansion ataxin-2-mediated neurodegeneration requires interaction with the protein TDP-43 [4, 34]. Therefore, one may speculate whether CNS degeneration in *ATXN2*-ALS takes place predominantly in brain regions where both genes (*ATXN2* and *TARDBP*) are highly expressed. This would explain the lack of anatomical association between the maps of brain structural damage in *ATXN2*-ALS and *ATXN2* expression.

The contrast between the radiological signatures of *ATXN2*-ALS and sALS is also noteworthy. In *ATXN2*-ALS, pathological change is confined to the brainstem and spinal cord. This is in sharp contrast with sALS where the precentral gyri are predominantly affected. From a methodological perspective, these results should be considered consistent. One may argue that the sample sizes for *ATXN2*-ALS and sALS are not large, but both groups were well matched (age, sex and clinical severity). In addition, we used a conservative statistical approach with adjustment for site of acquisition and for multiple comparisons in all analyses. In summary, our data indicate that sALS and *ATXN2*-ALS have distinctive structural signatures despite the shared clinical features. This is consistent with previous reports, which assessed specific subtypes of monogenic ALS (e.g., *VAPB*, *SOD1* and *C9orf72*) and found distinctive patterns in each of them relative to sALS [35–38] and distinct radiological changes may also be detected in the pre-symptomatic phase of the disease in association with specific genetic variants [39, 40]. It is increasingly clear that the evaluation of CNS pathology in ALS should be strictly stratified for genetic

factors (including disease-risk genes). Recently, Chió et al. were able to compare a large cohort of Italian patients with *ATXN2* ($n = 42$) and sALS ($n = 1288$) [41]. The authors found that the former group is characterized by more frequent spinal onset and faster progression. Considering that the severity of spinal cord damage in ALS is a well-known prognostic marker in ALS [42, 43], these findings correlate with our imaging results, where the spinal cord was the main site of pathological change.

Despite the originality of our findings, our study has some limitations that should be candidly acknowledged. As previously described, the cohorts' sizes were representative and well-characterized, but not large. Motor neuron predominance (upper vs lower motor neuron) in the ALS cohorts, eye movement analyses and other clinical features of the diseases were not assessed in this study and should provide interesting insights in future publications. In addition, we could only accomplish morphometric analyses (based on volumetric T1 acquisitions). This is due to the challenges to harmonize the brain DTI protocols across the 3 centers in due time. Accordingly, future studies are needed with larger cohorts and a more comprehensive MRI protocol to validate and expand our findings and examine disease trajectories longitudinally. It would be particularly useful to conduct advanced spinal cord imaging analyses, since this would enable analyses beyond pure morphometry (e.g., tract-specific DTI analyses), also including spinal levels below C4 [44, 45].

Conclusions

SCA2 and *ATXN2*-ALS have distinctive clinical and imaging features. While the brainstem and spinal cord are affected in both condition, the cerebellum and basal ganglia are solely affected in SCA2. Maps of structural alterations and *ATXN2* expression distribution overlap in SCA2, but not in *ATXN2*-ALS. Finally, volume reduction takes place in different regions in *ATXN2*-ALS (brainstem and spinal cord) and sALS (precentral cortices).

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00415-025-13037-9>.

Acknowledgements We extend our heartfelt gratitude to our patients and volunteer participants for their generosity and eagerness to contribute to science.

Funding This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants 2019/24240 - 7 and 2013/07559 - 3. Professor Bede was supported by the Health Research Board (HRB ELA- 2017 -019 and JPND-Cofund- 2- 2019 - 1), the EU Joint Programme—Neurodegenerative Disease Research (JPND), and Science Foundation Ireland (SFI SP20/SP/8953).

Declarations

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical standards The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinics Hospital at the University of Campinas (registered as "CAAE 29869520.8.3001.5404"). The study was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

References

1. Feldman EL, Goutman SA, Petri S, Mazzini L, Savellief MG, Shaw PJ, Sobue G (2022) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 400(10360):1363–1380
2. Velázquez-Pérez LC, Rodríguez-Labrada R, Fernandez-Ruiz J (2017) Spinocerebellar ataxia type 2: clinicogenetic aspects, mechanistic insights, and management approaches. *Front Neurol* 11(8):472
3. Laffita-Mesa JM, Paucar M, Svenningsson P (2021) Ataxin-2 gene: a powerful modulator of neurological disorders. *Curr Opin Neurol* 34(4):578–588
4. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Armakola M, Geser F, Greene R, Lu MM, Padmanabhan A, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Juhr D, Gruber PJ, Riib U, Auburger G, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Deerlin VM, Bonini NM, Gitler AD (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466(7310):1069–1075
5. Tavares de Andrade HM, Cintra VP, de Albuquerque M, Piccinin CC, Bonadia LC, DuarteCouteiro RE, Sabino de Oliveira D, Claudino R, MagnoGonçalves MV, Dourado MET Jr, de Souza LC, Teixeira AL, de Godoy Rousseff Prado L, Tumas V, Bulle Oliveira AS, Nucci A, Lopes-Cendes I, Marques W Jr, França MC Jr (2018) Intermediate-length CAG repeat in *ATXN2* is associated with increased risk for amyotrophic lateral sclerosis in Brazilian patients. *Neurobiol Aging* 69:292.e15-292.e18
6. Chió A, Calvo A, Moglia C, Canosa A, Brunetti M, Barberis M, Restagno G, Conte A, Bisogni G, Marangi G, Moncada A, Lattante S, Zollino M, Sabatelli M, Bagarotti A, Corrado L, Mora G, Bersano E, Mazzini L, D'Alfonso S, PARALS (2015) *ATXN2* polyQ intermediate repeats are a modifier of ALS survival. *Neurology* 84(3):251–258
7. Bede P, Elamin M, Byrne S, McLaughlin RL, Kenna K, Vajda A, Fagan A, Bradley DG, Hardiman O (2015) Patterns of cerebral and cerebellar white matter degeneration in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86(4):468–470
8. de Albuquerque M, Branco LM, Rezende TJ, de Andrade HM, Nucci A, França MC Jr (2017) Longitudinal evaluation of cerebral and spinal cord damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroimage Clin* 24(14):269–276
9. Bede P, Chipika RH, Christidi F, Hengeveld JC, Karavasilis E, Argyropoulos GD, Lope J, Li Hi Shing S, Velonakis G, Dupuis L, Doherty MA, Vajda A, McLaughlin RL, Hardiman O (2021) Genotype-associated cerebellar profiles in ALS: focal cerebellar pathology and cerebro-cerebellar connectivity alterations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 92(11):1197–1205
10. Chipika RH, Mulkerrin G, Pradat PF, Murad A, Ango F, Raoul C, Bede P (2022) Cerebellar pathology in motor neuron disease: neuroplasticity and neurodegeneration. *Neural Regen Res* 17(11):2335–2341. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.336139>. (PMID: 35535867)

11. Tahedi M, Tan EL, Kleinerova J, Delaney S, Hengeveld JC, Doherty MA, McLaughlin RL, Pradat PF, Raoul C, Ango F, Hardiman O, Chang KM, Lope J, Bede P (2024) Progressive cerebocerebellar uncoupling in sporadic and genetic forms of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 103(2):e209623. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000209623>. (Epub 2024 Jun 20; PMID: 38900989)
12. Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, van de Lagemaat LN, Smith KA, Ebbert A, Riley ZL, Abajian C, Beckmann CF, Bernard A, Bertagnoli D, Boe AF, Cartagena PM, Chakravarty MM, Chapin M, Chong J, Dalley RA, David Daly B, Dang C, Datta S, Dee N, Dolbeare TA, Faber V, Feng D, Fowler DR, Goldy J, Gregor BW, Haradon Z, Haynor DR, Hohmann JG, Horvath S, Howard RE, Jeromin A, Jochim JM, Kinnunen M, Lau C, Lazarz ET, Lee C, Lemon TA, Li L, Li Y, Morris JA, Overly CC, Parker PD, Parry SE, Reding M, Royall JJ, Schulkin J, Sequeira PA, Slaughterbeck CR, Smith SC, Sodt AJ, Sunkin SM, Swanson BE, Vawter MP, Williams D, Wonnoutka P, Zielke HR, Geschwind DH, Hof PR, Smith SM, Koch C, Grant SGN, Jones AR (2012) An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 489(7416):391–399
13. Project MinE ALS Sequencing Consortium (2018) Project MinE: study design and pilot analyses of a large-scale whole-genome sequencing study in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Hum Genet* 26(10):1537–1546
14. Kenna KP, McLaughlin RL, Byrne S, Elamin M, Heverin M, Kenny EM et al (2013) Delineating the genetic heterogeneity of ALS using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* 50(11):776–783
15. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A (1999) The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci* 169(1–2):13–21
16. Braga-Neto P, Godeiro-Junior C, Dutra LA, Pedrosa JL, Barsottini OG (2010) Translation and validation into Brazilian version of the Scale of the Assessment and Rating of Ataxia (SARA). *Arq Neuropsiquiatr* 68(2):228–230
17. Henschel L, Conjeti S, Estrada S, Diers K, Fischl B, Reuter M (2020) FastSurfer—a fast and accurate deep learning based neuroimaging pipeline. *Neuroimage* 219:117012
18. Henschel L, Kugler D, Reuter M (2022) FastSurferVINN: Building resolution-independence into deep learning segmentation methods—a solution for HighRes brain MRI. *Neuroimage* 251:118933
19. Faber J, Kugler D, Bahrami E, Heinz LS, Timmann D, Ernst TM, Deike-Hofmann K, Klockgether T, van de Warrenburg B, van Gaalen J, Reetz K, Romanzetti S, Oz G, Joers JM, Diedrichsen J, Reuter M (2022) CerebNet: A fast and reliable deep-learning pipeline for detailed cerebellum sub-segmentation. *Neuroimage* 264(1):119703. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119703>. (Epub 2022 Oct 27; PMID: 36349595; PMCID: PMC9771831)
20. De Leener B, Lévy S, Dupont SM, Fonov VS, Stikov N, Louis Collins D, Callot V, Cohen-Adad J (2017) SCT: Spinal Cord Toolbox, an open-source software for processing spinal cord MRI data. *Neuroimage* 15(145)(Pt A):24–43
21. Talairach J, Tournoux P (eds) (1988) Co-planar stereotaxic atlas of the human brain. Thieme, New York
22. Iglesias JE, Van Leemput K, Bhatt P, Casillas C, Dutt S, Schuff N, Truran-Sacrey D, Boxer A, Fischl B, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015) Bayesian segmentation of brainstem structures in MRI. *Neuroimage* 113:184–195. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.02.065>. (Epub 2015 Mar 14; PMID: 25776214; PMCID: PMC4434226)
23. Fischl B (2012) FreeSurfer. *Neuroimage* 62(2):774–781
24. Faber J, Kugler D, Bahrami E, Heinz LS, Timmann D, Ernst TM, Deike-Hofmann K, Klockgether T, van de Warrenburg B, van Gaalen J, Reetz K, Romanzetti S, Oz G, Joers JM, Diedrichsen J, ESMI MRI Study Group, Reuter M (2022) CerebNet: a fast and reliable deep-learning pipeline for detailed cerebellum sub-segmentation. *Neuroimage* 264:119703. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119703>. (Epub 2022 Oct 27; PMID: 36349595; PMCID: PMC9771831)
25. De Leener B, Lévy S, Dupont SM, Fonov VS, Stikov N, Louis Collins D, Callot V, Cohen-Adad J (2017) SCT: Spinal Cord Toolbox, an open-source software for processing spinal cord MRI data. *Neuroimage* 145(Pt A):24–43
26. Hawrylycz M, Miller JA, Menon V, Feng D, Dolbeare T, Guillozet-Bongaarts AL, Jegga AG, Aronow BJ, Lee CK, Bernard A, Glasser MF, Dierker DL, Menche J, Szafer A, Collman F, Grange P, Berman KA, Mihalas S, Yao Z, Stewart L, Barabási AL, Schulkin J, Phillips J, Ng L, Dang C, Haynor DR, Jones A, Van Essen DC, Koch C, Lein E (2015) Canonical genetic signatures of the adult human brain. *Nat Neurosci* 18(12):1832–1844
27. Rittman T, Rubinov M, Vértés PE, Patel AX, Ginstet CE, Ghosh BCP, Barker RA, Spillantini MG, Bullmore ET, Rowe JB (2016) Regional expression of the MAPT gene is associated with loss of hubs in brain networks and cognitive impairment in Parkinson disease and progressive supranuclear palsy. *Neurobiol Aging* 48:153–160
28. Rascofsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, van Swieten JC, Seelaar H, Dopper EGP, Onyike CU et al (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain J Neurol* 134:2456–2477. <https://doi.org/10.1093/Brain/Awr179>
29. Costa RG, Conceição A, Matos CA, Nóbrega C (2024) The polyglutamine protein ATXN2: from its molecular functions to its involvement in disease. *Cell Death Dis* 15(6):415
30. Reetz K, Rodríguez-Labrada R, Dogan I, Mirzazade S, Romanzetti S, Schulz JB, Cruz-Rivas EM, Alvarez-Cuesta JA, Aguilera Rodríguez R, Gonzalez Zaldivar Y, Auburger G, Velázquez-Pérez L (2018) Brain atrophy measures in preclinical and manifest spinocerebellar ataxia type 2. *Ann Clin Transl Neurol* 5(2):128–137
31. Rezende TJR, Adanyaguh I, Barsottini OGP, Bender B, Cendes F, Coutinho L, Deistung A, Dogan I, Durr A, Fernandez-Ruiz J, Göröcke SL, Grisoli M, Hernandez-Castillo CR, Lenglet C, Mariotti C, Martinez ARM, Massuyama BK, Mochel F, Nanetti L, Nigri A, Ono SE, Öz G, Pedrosa JL, Reetz K, Synofzik M, Teive H, Thomopoulos SI, Thompson PM, Timmann D, van de Warrenburg BPC, van Gaalen J, Franca MC Jr, Harding IH (2024) Genotype-specific spinal cord damage in spinocerebellar ataxias: an ENIGMA-Ataxia study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 95(7):682–690
32. de Borja FC, Fernandes JMS, de Rezende TJR, González-Salazar C, de Melo Teixeira Branco L, Wolmer PS, Pedrosa JL, Barsottini OGP, Franca Junior MC (2024) Tract-specific spinal damage in SCA2, SCA3 and SCA6. *J Neurol* 272(1):6. <https://doi.org/10.1007/s00415-024-12791-6>
33. Scoles DR, Meera P, Schneider MD, Paul S, Sansithong W, Figueroa KP, Hung G, Rigo F, Bennett CF, Otis TS, Pulst SM (2017) Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2. *Nature* 544(7650):362–366
34. Vieira de Sá R, Sudria-Lopez E, Cañizares Luna M, Harschnitz O, van den Heuvel DMA, Kling S, Vonk D, Westeneng HJ, Karst H, Bloemenkamp L, Vardieridou-Minasian S, Schlegel DK, Mars M, Broekhoven MH, van Kronenburg NCH, Adolfs Y, Vangoor VR, de Jongh R, Ljubikj T, Peeters L, Seeler S, Mocholi E, Basak O, Gordon D, Giuliani F, Verhoeft T, Korsten G, Calafat Pla T, Venø MT, Kjems J, Talbot K, van Es MA, Veldink JH, van den Berg LH, Zelina P, Pasterkamp RJ (2024) ATAXIN-2 intermediate-length

- polyglutamine expansions elicit ALS-associated metabolic and immune phenotypes. *Nat Commun* 15(1):7484
35. Leoni TB, Rezende TJR, Peluzzo TM, Martins MP, Neto ARC, Gonzalez-Salazar C, Cruzeiro MM, Camargos ST, de Souza LC, França MC Jr (2022) Structural brain and spinal cord damage in symptomatic and pre-symptomatic VAPB-related ALS. *J Neurol Sci* 15(434):120126
 36. Agosta F, Spinelli EG, Marjanovic IV, Stevic Z, Pagani E, Valsasina P, Salak-Djokic B, Jankovic M, Lavnric D, Kostic VS, Filippi M (2018) Unraveling ALS due to *SOD1* mutation through the combination of brain and cervical cord MRI. *Neurology* 90(8):e707–e716
 37. Bede P, Bokde AL, Byrne S, Elamin M, McLaughlin RL, Kenna K, Fagan AJ, Pender N, Bradley DG, Hardiman O (2013) Multiparametric MRI study of ALS stratified for the C9orf72 genotype. *Neurology* 81(4):361–369
 38. LiHiShing S, McKenna MC, Siah WF, Chipika RH, Hardiman O, Bede P (2021) The imaging signature of C9orf72 hexanucleotide repeat expansions: implications for clinical trials and therapy development. *Brain Imaging Behav* 15(5):2693–2719. <https://doi.org/10.1007/s11682-020-00429-w>. (Epub 2021 Jan 5; PMID: 33398779)
 39. Lulé DE, Müller HP, Finsel J, Weydt P, Knehr A, Winth I, Andersen P, Weishaupt J, Uttner I, Kassubek J, Ludolph AC (2020) Deficits in verbal fluency in presymptomatic C9orf72 mutation gene carriers—a developmental disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91(11):1195–1200. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323671>. (Epub 2020 Aug 27; PMID: 32855285)
 40. Bede P, Lulé D, Müller HP, Tan EL, Dorst J, Ludolph AC, Kassubek J (2023) Presymptomatic grey matter alterations in ALS kindreds: a computational neuroimaging study of asymptomatic C9orf72 and SOD1 mutation carriers. *J Neurol* 270(9):4235–4247. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11764-5>. (Epub 2023 May 13; PMID: 37178170)
 41. Chio A, Moglia C, Canosa A, Manera U, Grassano M, Vasta R, Palumbo F, Gallone S, Brunetti M, Barberis M, De Marchi F, Dalgard C, Chia R, Mora G, Iazzolino B, Peotta L, Traynor B, Corrado L, D'Alfonso S, Mazzini L, Calvo A (2022) Exploring the phenotype of Italian patients with ALS with intermediate *ATXN2* polyQ repeats. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 93(11):1216–1220
 42. Querin G, El Mendili MM, Lenglet T, Delphine S, Marchand-Pauvert V, Benali H, Pradat PF (2017) Spinal cord multiparametric magnetic resonance imaging for survival prediction in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 24(8):1040–1046
 43. Branco LM, De Albuquerque M, De Andrade HM, Berço FP, Nucci A, França MC Jr (2014) Spinal cord atrophy correlates with disease duration and severity in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 15(1–2):93–97
 44. Branco LMT, Rezende TJR, Reis F, França MC Jr (2023) Advanced structural magnetic resonance imaging of the spinal cord: technical aspects and clinical use. *Semin Ultrasound CT MR* 44(5):464–468
 45. McKenna MC, Kleinerova J, Power A, Garcia-Gallardo A, Tan EL, Bede P (2024) Quantitative and computational spinal imaging in neurodegenerative conditions and acquired spinal disorders: academic advances and clinical prospects. *Biology (Basel)* 13(11):909. <https://doi.org/10.3390/biology13110909>. (PMID: 39596864)

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

5. DISCUSSÃO GERAL

As doenças neurodegenerativas associadas ao gene *ATXN2*, particularmente a SCA2 e a ELA-*ATXN2*, representam um espectro de condições com mecanismos fisiopatológicos distintos, mas inter-relacionados(41,42). O presente estudo teve como objetivo caracterizar as assinaturas estruturais do sistema nervoso central nessas patologias, utilizando técnicas avançadas de neuroimagem para avaliar a atrofia cerebral e espinhal e potenciais correlações clínicas.

Embora o foco central desta tese seja a caracterização clínica e estrutural das doenças associadas ao gene *ATXN2*, optou-se por incluir, no primeiro capítulo e artigo, pacientes com SCA3 e SCA6 como grupos comparativos. Essa decisão visou contextualizar os achados observados na SCA2 dentro do espectro mais amplo das ataxias espinocerebelares, permitindo identificar padrões de acometimento específicos ou compartilhados entre os subtipos. Além disso, a inclusão desses grupos foi parte de um encadeamento lógico, ilustrado pela **Figura 4**, iniciado pelo conhecimento de que a ELA teria um fator genético, que se conecta com a SCA2, que por sua vez está associada fenotipicamente a outras SCAs, como a SCA3 e SCA6, e portanto a dúvida de que se há um substrato anatômico específico para cada forma genética, podemos estudar através de métodos de neuroimagem avançada ainda não explorados nesses diagnósticos.

Essa inclusão possibilitou distinguir achados estruturais relacionados ao fenótipo, reforçando a especificidade das alterações observadas na SCA2 e oferecendo um referencial anatômico e funcional mais robusto para interpretação dos dados.

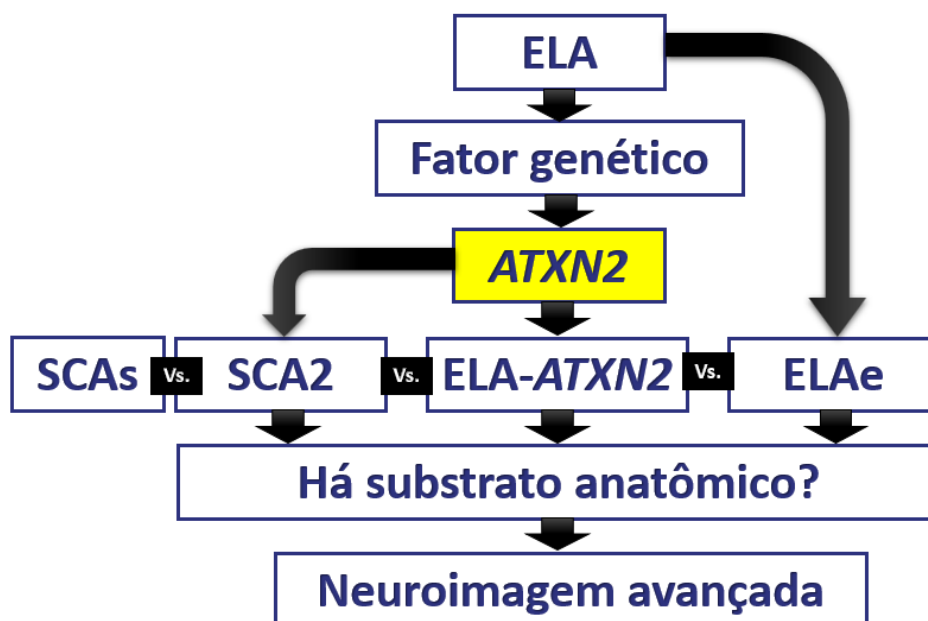


Figura 4: Fluxograma ilustrativo do racional que conecta os dois capítulos da tese. A constatação que pacientes com ELA tem um fator genético complexo, incluindo o gene *ATXN2* como fator de risco, nos leva a questionar qual o substrato anatômico dos diferentes genótipos associados fenotipicamente, e se há padrões de lesão confluentes ou divergentes. Finalmente nesse raciocínio a neuroimagem avançada se destaca como ferramenta para esclarecimento da pergunta de pesquisa, como empregado na tese.

5.1 Capítulo 1: Neuroimagem medular em SCA2, SCA3 e SCA6

O primeiro capítulo desta tese demonstrou, por meio de uma abordagem multimodal com o uso da ferramenta SCT(156), que os subtipos SCA2 e SCA3 apresentam comprometimento estrutural significativo na medula espinal cervical, ao passo que a SCA6 não mostrou alterações detectáveis.

5.1.1 Atrofia medular como marcador estrutural de SCA2 e SCA3

A investigação da atrofia medular nas ataxias espinocerebelares por meio de medidas morfométricas ainda é limitada na literatura, especialmente no que se refere à SCA2. Dados quantitativos sistemáticos sobre morfometria medular na SCA2 permanecem escassos, com exceção de uma análise recente conduzida no âmbito do estudo multicêntrico ENIGMA-Ataxia(153). Nesse contexto, os resultados do presente estudo figuram entre os primeiros dados da literatura para a caracterização estrutural da medula espinal na SCA2, evidenciando de forma robusta a presença de atrofia medular significativa por meio de mensuração da

CSA. Essa contribuição é relevante para o avanço do conhecimento sobre os substratos anatômicos envolvidos na SCA2 e reforça o papel da morfometria medular como ferramenta potencial na investigação da fisiopatologia e progressão dessa doença.

Na SCA2, a redução significativa da CSA medular se alinha a evidências neuropatológicas previamente descritas, que apontam para a degeneração extensa das colunas dorsais, tratos espinocerebelares e outras regiões medulares(160). A correlação negativa entre a CSA e o tempo de doença observada neste grupo sugere que a atrofia medular evolui progressivamente ao longo do curso clínico, sendo, portanto, um possível marcador de progressão da doença. Tal associação reforça a utilidade da morfometria medular como ferramenta de monitoramento longitudinal, restando saber se o comprometimento da medula pode preceder a deterioração funcional de forma mensurável por métodos avançados de imagem, o que não foi avaliado no presente estudo, porém é possível alvo de investigações futuras em grupos pré-sintomáticos.

Na SCA3, também foi identificada redução significativa da CSA, indicando que a medula espinhal é um sítio relevante de degeneração anatômica nesse subtipo. Embora não tenha havido correlação entre a CSA e a duração da doença neste grupo, o achado morfométrico apoia relatos neuropatológicos prévios que descrevem degeneração em múltiplas regiões da medula, como a coluna de Clarke, cornos anteriores e tratos longos descendentes e ascendentes(106,161).

O fato de não ter sido observada uma correlação com a duração da doença pode refletir maior heterogeneidade fenotípica ou diferenças na taxa de progressão da degeneração medular na SCA3, quando comparada à SCA2, entretanto tal resultado deve ser interpretado com cautela, devendo ser confirmado à luz de estudos multicêntricos com maiores populações de estudo.

Em contraste, pacientes com SCA6 não apresentaram alterações significativas na CSA, o que é consistente com o padrão clínico e neuropatológico previamente descrito, caracterizada por um acometimento predominantemente cerebelar e ausência de envolvimento medular relevante, clínico ou neuropatológico(23,104).

Esse achado, embora sem ineditismo, reforça o potencial da morfometria medular como marcador diferencial entre subtipos de SCA, com possível aplicabilidade na prática clínica e em protocolos de diagnóstico por imagem.

Em conjunto, os dados morfométricos deste estudo reforçam a relevância da medula espinhal como estrutura acometida nas SCAs tipo 2 e 3 e sugerem que a quantificação da atrofia medular por meio de imagens de ressonância magnética pode representar um biomarcador estrutural promissor para essas doenças.

Estudos longitudinais e com maior poder amostral são necessários para validar seu uso no monitoramento da progressão e para melhor compreender as implicações clínicas da atrofia medular nas diferentes SCAs.

5.1.2 Microestrutura dos tratos medulares: evidência de dano axonal e desmielinização

Além da avaliação morfométrica da medula espinhal, esta tese incorporou de forma pioneira na literatura, análises microestruturais de tratos específicos através de DTI, permitindo a investigação da integridade da substância branca medular na SCA2. Esta abordagem possibilitou a identificação de assinaturas microestruturais distintas entre os subtipos SCA2, SCA3 e SCA6, refletindo a heterogeneidade do envolvimento medular nesse espectro de doenças.

Foram encontradas reduções significativas na FA dos tratos corticoespinhais, espinocerebelares, fascículos grácil e cuneiforme dos pacientes dos grupos SCA2 e SCA3, com um grande tamanho do efeito, além de alterações menos proeminentes nos valores de AD e RD no caso da SCA2.

A FA é uma medida sensível à organização direcional das fibras da substância branca. A redução dos valores de FA reflete perda de coerência microestrutural, podendo indicar tanto degeneração axonal quanto desmielinização ou desorganização das fibras, o que compromete a condução eficiente de impulsos nervosos(136,138,162). Em doenças neurodegenerativas, como as SCAs, a diminuição da FA pode ser interpretada como marcador de dano tecidual e perda da integridade das vias longitudinais da medula espinhal(137,163).

As métricas derivadas de DTI permitem inferir não só a presença, mas também a natureza da lesão da substância branca, especialmente os mapas de

AD e RD. A AD representa a difusão da água ao longo do principal eixo das fibras e tem sido amplamente utilizada como marcador indireto de integridade axonal. Por sua vez, a RD quantifica a difusão perpendicular à direção principal e está associada à integridade mielínica, sendo frequentemente relacionada a processos de desmielinização ou disfunção de oligodendrócitos(164,165).

Nos pacientes com SCA2, a redução dos valores de FA e aumento nos valores de AD e RD podem sugerir comprometimento tanto axonal quanto mielínico. Dessa forma, os achados de DTI fornecem subsídios adicionais sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à degeneração medular na SCA2.

Na SCA3, também foram evidenciadas alterações microestruturais relevantes, com redução significativa da FA e aumento de RD em múltiplos tratos da medula espinhal, indicando prejuízo na organização direcional das fibras e possível perda mielínica. A presença de correlação entre os valores de RD no fascículo cuneiforme esquerdo em C3 e os escores da escala SARA sugere que essas alterações microestruturais possuem relevância clínica e podem refletir, ao menos parcialmente, o grau de disfunção motora observado nesses pacientes.

A ausência de alterações significativas nos índices de difusão nos pacientes com SCA6, por outro lado, reforça a natureza predominantemente cerebelar dessa forma de ataxia e a relativa preservação da substância branca medular. Essa dissociação entre os subtipos evidencia o potencial da DTI medular como ferramenta sensível para discriminar diferentes padrões de envolvimento anatômico nas SCAs.

Em conjunto, os dados de DTI obtidos neste estudo ampliam o conhecimento sobre a fisiopatologia das SCAs, demonstrando que as alterações microestruturais medulares são marcantes nas formas associadas à SCA2 e SCA3, mas ausentes na SCA6.

5.1.3 Correlações clínico-radiológicas e potencial como biomarcador

A análise das correlações entre os achados de neuroimagem e as variáveis clínicas revelou padrões distintos entre os subtipos avaliados. Em pacientes com SCA2, os parâmetros morfométricos e microestruturais da medula espinhal apresentaram correlação significativa com a duração da doença, mas não com a gravidade clínica, conforme avaliada pela escala SARA. Esse padrão sugere

que, na SCA2, o comprometimento medular ocorre de forma progressiva ao longo do tempo, sendo um marcador sensível da cronologia da doença, ainda que sua repercussão funcional não esteja plenamente refletida nas medidas clínicas utilizadas. A ausência de associação com os escores da SARA pode refletir o fato de que essa escala, embora amplamente empregada na avaliação de SCAs, tem maior acurácia para achados motores, sendo os achados relativos às vias ascendentes mais bem avaliados por escalas que considerem com igual relevância o aspecto sensitivo(166).

Os tratos medulares mais acometidos nos pacientes com SCA2 foram os fascículos grácil e cuneiforme, ambos responsáveis pela condução de informações proprioceptivas conscientes e vibração aos níveis superiores do sistema nervoso central. A degeneração dessas vias pode contribuir para manifestações clínicas frequentemente descritas na SCA2, não só ataxia sensitiva, mas também déficits de sensibilidade profunda. Adicionalmente, a presença de sinais piramidais relatada em séries clínicas de SCA2, pode estar associada à degeneração de tratos descendentes medulares encontrada.

Na SCA3, por outro lado, observou-se correlação entre os índices de difusão em tratos específicos da medula espinhal e os escores clínicos da SARA, sem associação significativa com a duração da doença. Esse achado pode refletir uma maior influência do envolvimento espinhal na manifestação clínica.

Essas observações sustentam a hipótese de que os biomarcadores derivados da ressonância magnética da medula espinhal podem refletir aspectos distintos da fisiopatologia entre os subtipos de SCA e, nesse contexto, podem auxiliar na estratificação fenotípica dos pacientes. A incorporação de medidas estruturais e microestruturais da medula em protocolos clínicos e de pesquisa pode contribuir para uma caracterização mais precisa do envolvimento neurológico, permitindo distinguir padrões com diferentes implicações prognósticas e funcionais. A utilização combinada de dados clínicos e neuroimagem avançada tem, portanto, potencial para melhorar a sensibilidade na detecção de sinais precoces, bem como para a definição de subgrupos com características distintas de progressão, o que é especialmente relevante no contexto de ensaios clínicos e de intervenções terapêuticas personalizadas.

Finalmente, é essencial ressaltar que este estudo apresenta limitações importantes, como o tamanho amostral reduzido, centro único e delineamento transversal, que impedem inferências sobre a progressão temporal das alterações observadas. Além disso, a ausência de dados neurofisiológicos limita a correlação entre achados estruturais e função medular. Estudos longitudinais, com amostras ampliadas e caracterização clínica e funcional mais abrangente, são necessários para validar e expandir os achados aqui reportados.

5.2 Capítulo 2: Neuroimagem multimodal em SCA2, ELA e ELA-ATXN2

O segundo estudo da tese expandiu a análise de neuroimagem para além da SCA2, explorando o espectro das doenças relacionadas à *ATXN2*, incluindo SCA2, ELA-*ATXN2* e ELAe, a partir de abordagens morfométricas cerebrais, cerebelares e espinhais integradas à correlação com um mapa de expressão genética.

5.2.1 Atrofia difusa e assinatura anatômica ampla na SCA2

A proteína ataxina-2, codificada pelo gene *ATXN2*, está envolvida em múltiplos processos celulares essenciais, incluindo regulação da tradução, homeostase de RNA, formação de grânulos de estresse e dinâmica de membranas(41,62). Sua expressão é difusa no sistema nervoso central, mas apresenta níveis particularmente elevados em regiões como o cerebelo, tronco encefálico, tálamo e medula espinal, conforme demonstrado por dados transcriptômicos do *Allen Human Brain Atlas* apresentados no capítulo 2(158).

Em modelos experimentais de SCA2, a ataxina-2 alterada promove disfunções celulares via mecanismos de ganho tóxico de função, incluindo acúmulo de agregados proteicos, perda da homeostase de RNA e alterações na excitabilidade neuronal, culminando em degeneração progressiva(30,45).

Pacientes com SCA2 apresentaram um padrão caracterizado por atrofia extensa, englobando cerebelo, tronco encefálico, núcleos da base, córtex motor e medula espinal. Essa assinatura anatômica multisistêmica condiz com as manifestações clínicas heterogêneas da SCA2 e confirma a presença de degeneração além da via cerebelar clássica. Além disso, o padrão espacial de atrofia apresentou correlação topográfica significativa com os mapas de

expressão do gene *ATXN2*, sugerindo um mecanismo de toxicidade dependente da expressão regional da ataxina-2 como descrito anteriormente(30,38).

Embora os achados de atrofia em regiões vulneráveis na SCA2 já tenham sido previamente descritos, a análise conjunta com dados de expressão gênica regional representa um diferencial deste estudo. A correlação espacial com o padrão de expressão do *ATXN2* oferece uma contribuição adicional à interpretação fisiopatológica, ainda pouco explorado em publicações anteriores.

5.2.2 ELA-ATXN2: perfil anatômico restrito com envolvimento de tronco encefálico e medular

Na ELA-*ATXN2*, o padrão de atrofia foi mais restrito, com acometimento predominantemente focal do tronco encefálico e da medula cervical, não houve envolvimento significativo do córtex motor ou do cerebelo.

Diferentemente do observado em SCA2, as regiões afetadas não coincidiram com os locais de maior expressão do gene *ATXN2* exibidas no *Allen Human Brain Atlas*. Essa dissociação sugere que o mecanismo fisiopatológico subjacente à ELA-*ATXN2* pode não decorrer diretamente da toxicidade celular em regiões de alta expressão do gene, como no caso das SCAs, mas sim de um efeito modulador de vias comuns à ELAe.

Há dados na literatura sugerindo que alelos intermediários de *ATXN2* aumentam a vulnerabilidade neuronal por promoverem desregulação da homeostase de RNA indiretamente através da formação anômala de agregados de TDP-43, proteína nuclear envolvida na patogênese da maioria dos casos de ELAe(35,37,45,129). Assim, os achados do presente estudo corroboram a concepção de que a ELA-*ATXN2* representa um subtipo molecular com vias fisiopatológicas parcialmente sobrepostas às da ELAe, mas com mecanismos desencadeadores distintos e potencialmente mais sensíveis à instabilidade do RNA e à disfunção dos mecanismos de processamento pós-transcricional(59). Não obstante, essa hipótese é ainda amparada pelo dado epidemiológico de que a expansão intermediária da *ATXN2* não só é um alelo de risco, mas também modulador da gravidade clínica(55,58).

Uma hipótese adicional, embora especulativa, para explicar esse padrão de lesão é que, a degeneração do sistema nervoso central na ELA-*ATXN2*

ocorra, preferencialmente, em regiões onde ambos os genes, *ATXN2* e *TARDBP*, que codifica a proteína TDP-43, apresentam alta expressão.

Por fim, a ausência de comprometimento do córtex motor no grupo ELA-*ATXN2* contrasta com achados robustos da literatura em ELAe. Tal discrepância pode refletir um mecanismo próprio, mas é também possível fruto de limitações relacionadas ao tamanho da amostra, não devendo ser interpretada como ausência definitiva de envolvimento cortical. Estudos com maior poder estatístico são importantes para elucidar esse ponto.

5.2.3 ELAe: padrão cortical restrito e ausência de acometimento medular

No subgrupo de pacientes com ELAe, os achados do capítulo 2 evidenciaram atrofia restrita ao giro pré-central, sem evidência de lesões em tronco, cerebelo ou medula espinal. Este achado reforça a hipótese de que a ELAe compartilha menos sobreposição estrutural com os fenótipos relacionados ao *ATXN2*.

Essa dissociação topográfica sugere que mecanismos fisiopatológicos diferentes podem estar implicados em cada subtipo, apesar do fenótipo motor compartilhado. É possível argumentar a favor da necessidade da confirmação dos dados, porém, o método adotado, incluindo o pareamento entre os grupos por idade, sexo e gravidade clínica, bem como o ajuste estatístico por centro e para múltiplas comparações, confere maior confiabilidade aos resultados obtidos. Esses achados reforçam a heterogeneidade anatômica da ELA e destacam a importância de abordagens baseadas em subtipos moleculares para a compreensão da diversidade estrutural da doença.

5.2.4 Correlações clínico-radiológicas e contribuições para o entendimento fisiopatológico das doenças associadas ao gene *ATXN2*

As correlações clínicas observadas reforçam a relevância funcional dos achados estruturais identificados neste estudo. No grupo com ELAe, a ausência de associação entre a espessura cortical pré-central e os escores de gravidade ou duração da doença sugere que marcadores corticais isolados podem não refletir com precisão a progressão clínica em determinados casos. Em contraste, no grupo ELA-*ATXN2*, tanto a CSA da medula cervical quanto o volume do mesencéfalo apresentaram correlação positiva com os escores do ALSFRS-R, permitindo especular que alterações em regiões caudais do neuroeixo estariam

mais relacionadas ao status funcional nesses pacientes, como descrito previamente(167).

Além disso, no grupo SCA2, os volumes de diversos lóbulos cerebelares mostraram associação robusta com a gravidade da ataxia, conforme mensurada pela escala SARA, corroborando o papel do cerebelo como substrato anatômico crucial, embora não exclusivo, do quadro clínico. Esses dados sugerem que, embora os três grupos compartilhem aspectos motores em comum, os correlatos clínico-radiológicos são específicos a cada subtipo, refletindo diferentes trajetórias anatômico-funcionais de neurodegeneração.

Os achados estruturais obtidos neste estudo contribuem para o debate sobre a existência de um espectro clínico-patológico contínuo entre SCA2 e ELA-*ATXN2*, ou se estas representam entidades biologicamente distintas. Embora haja intersecção genética entre ambas, os padrões de neurodegeneração identificados por neuroimagem quantitativa foram notavelmente dissociados. A SCA2 demonstrou acometimento extenso e difuso, enquanto a ELA-*ATXN2* apresentou envolvimento restrito ao tronco encefálico e medula, e a ELAe foi marcada por atrofia isolada no córtex pré-central.

Caso houvesse um espectro em gradiente de degeneração anátomo-funcional entre SCA2 e a ELA, seria esperado encontrar sobreposições graduais ou zonas de transição entre os grupos, o que não se observou. Esses achados favorecem a interpretação de que mecanismos moleculares distintos orientam a topografia da degeneração em cada fenótipo clínico, desafiando a ideia de um contínuo linear e apoiando, ao menos estruturalmente, uma organização dicotômica entre as doenças associadas ao gene *ATXN2*.

6. CONCLUSÃO

1. Pacientes com SCA2 e SCA3 apresentaram atrofia medular cervical e alterações microestruturais nos tratos da substância branca enquanto pacientes com SCA6 não apresentaram alterações significativas.
2. Em pacientes com SCA2 e SCA3, houve correlação dos dados por neuroimagem avançada com a gravidade da doença, com características próprias de cada grupo.
3. A ELA-*ATXN2*, ELAe e SCA2 apresentam padrões de lesão distintos com intersecções: na ELA-*ATXN2* observa-se comprometimento do tronco encefálico e da medula espinhal; na ELAe, as alterações restringem-se predominantemente ao córtex motor; enquanto na SCA2 identifica-se um acometimento difuso, envolvendo tanto o encéfalo quanto a medula espinhal.
4. Achados medulares e mesencefálicos se correlacionam com achados da ALSFRS-R no grupo ELA-*ATXN2*. Volumes cerebelares se correlacionam a escala SARA no grupo SCA2.
5. Mapas de expressão gênica se correlacionam com padrão lesional na SCA2 mas não na ELA-*ATXN2*

7. REFERÊNCIAS

1. Li L, Wang M, Huang L, Zheng X, Wang L, Miao H. Ataxin-2: a powerful RNA-binding protein. *Discover Oncology* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Jul 5];15(1):298. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11263328/>
2. Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* [Internet]. 1998 Nov 6 [cited 2025 Feb 22];282(5391):1079–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9804539/>
3. Lamprey RNL, Chaulagain B, Trivedi R, Gothwal A, Layek B, Singh J. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2025 Feb 22];23(3):1851. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8837071/>
4. Kelser BM, Teichner EM, Subtilu RC, Hoss KN. A review of proposed mechanisms for neurodegenerative disease. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2024 Oct 8 [cited 2025 Feb 22];16:1370580. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39439710>
5. Coppede F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L. Genes and the environment in neurodegeneration. *Biosci Rep*. 2006 Oct;26(5):341–67.
6. Bayer TA. Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders? *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2025 Feb 23];25(5):713–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23642796/>
7. dos Santos Picanco LC, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, Pinheiro AA, Padilha EC, Braga FS, et al. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr Med Chem* [Internet]. 2018 Dec 30 [cited 2025 Feb 23];25(26):3141–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30191777/>
8. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza O V. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem*. 2012 May 29;65:329–52.
9. Morris HR, Spillantini MG, Sue CM, Williams-Gray CH. The pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet* [Internet]. 2024 Jan 20 [cited 2025 Feb 23];403(10423):293–304. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S0140673623014782>
10. Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51(6):745–52.
11. Tabrizi SJ, Flower MD, Ross CA, Wild EJ. Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Neurology* 2020 16:10 [Internet]. 2020 Aug 14 [cited 2025 Feb 23];16(10):529–46. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-020-0389-4>
12. Raymond LA, André VM, Cepeda C, Gladding CM, Milnerwood AJ, Levine MS. Pathophysiology of Huntington's Disease: Time-Dependent Alterations in Synaptic and

- Receptor Function. *Neuroscience* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2025 Feb 23];198:252. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3221774/>
13. Bustamante-Barrientos FA, Luque-Campos N, Araya MJ, Lara-Barba E, de Solminiach J, Pradenas C, et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders: Potential therapeutic application of mitochondrial transfer to central nervous system-residing cells. *J Transl Med* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Feb 23];21(1):1–27. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-023-04493-w>
 14. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 3, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2017.
 15. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 390, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2017. p. 2084–98.
 16. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2001;344(22):1688–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200105313442207>
 17. Valdmann P, Rouleau G. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2007;70(2):144–52.
 18. Swinnen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. Nature Publishing Group [Internet]. 2014;10(11):661–70. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneurol.2014.184>
<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.184>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25311585>
 19. Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2013;14(4):248–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463272>
 20. Salameh JS, Brown RH, Berry JD. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Review. *Semin Neurol*. 2015 Aug 1;35(4):469–76.
 21. Witzel S, Mayer K, Oeckl P. Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2025 Feb 23];35(5):699–704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35942674/>
 22. Paulson HL. The spinocerebellar ataxias. *J Neuroophthalmol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Aug 7];29(3):227–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726947>
 23. Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H. Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol*. 2019 Feb 3;266(2):533–44.
 24. Iwabuchi K, Tsuchiya K, Uchihara T, Yagishita S. Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. *Rev Neurol (Paris)* [Internet]. 1999 Apr [cited 2017 Oct 16];155(4):255–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10367323>

25. Martins CR, Martinez ARM, de Rezende TJR, Branco LMT, Pedroso JL, Barsottini OGP, et al. Spinal Cord Damage in Spinocerebellar Ataxia Type 1. *The Cerebellum* [Internet]. 2017 Aug 6 [cited 2017 Oct 16];16(4):792–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386793>
26. Pedroso JL, Barsottini OGP. Spinal cord atrophy in spinocerebellar ataxia type 1. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2017 Oct 16];71(12):977–977. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347021>
27. Seidel K, Siswanto S, Brunt ERP, den Dunnen W, Korf HW, Rüb U. Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2012 Jul 9 [cited 2017 Oct 16];124(1):1–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-012-1000-x>
28. Meira AT, Arruda WO, Ono SE, Neto A de C, Raskin S, Camargo CHF, et al. Neuroradiological Findings in the Spinocerebellar Ataxias. Tremor and Other Hyperkinetic Movements [Internet]. 2019 [cited 2025 Feb 23];9:10.7916/tohm.v0.682. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6765228/>
29. Döhlinger S, Hauser TK, Borkert J, Luft AR, Schulz JB. Magnetic resonance imaging in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum*. 2008;7(2):204–14.
30. Costa RG, Conceição A, Matos CA, Nóbrega C. The polyglutamine protein ATXN2: from its molecular functions to its involvement in disease. *Cell Death & Disease* 2024 15:6 [Internet]. 2024 Jun 14 [cited 2025 Feb 22];15(6):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-024-06812-5>
31. Ghosh P, Saadat A. Neurodegeneration and epigenetics: A review. *Neurologia* [Internet]. 2023 Jul [cited 2025 Feb 23];38(6):e62–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37344098/>
32. Qu W, Zhuang Y, Li X. The roles of epigenetic modifications in neurodegenerative diseases. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2021 Oct 25;50(5):642–50.
33. Pulst SM. Spinocerebellar Ataxia Type 2: A Review and Personal Perspective. *Neurol Genet*. 2025 Jan 27;11(1).
34. Tavares de Andrade HM, Cintra VP, de Albuquerque M, Piccinin CC, Bonadia LC, Duarte Coutinho RE, et al. Intermediate-length CAG repeat in ATXN2 is associated with increased risk for amyotrophic lateral sclerosis in Brazilian patients. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2020 Oct 28];69:292.e15-292.e18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29934271/>
35. Glass JD, Dewan R, Ding J, Gibbs JR, Dalgard C, Keagle PJ, et al. ATXN2 intermediate expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 Feb 23];145(8):2671–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35521889/>
36. Ou K, Jia Q, Li D, Li S, Li XJ, Yin P. Application of antisense oligonucleotide drugs in amyotrophic lateral sclerosis and Huntington’s disease. *Translational Neurodegeneration* 2025 14:1 [Internet]. 2025 Jan 21 [cited 2025 Feb 24];14(1):1–13. Available from: <https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-025-00466-9>

37. Van Damme P, Veldink JH, Van Blitterswijk M, Corveleyn A, Van Vught PWJ, Thijs V, et al. Expanded ATXN2 CAG repeat size in ALS identifies genetic overlap between ALS and SCA2. *Neurology* [Internet]. 2011 Jun 14 [cited 2025 Feb 24];76(24):2066–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21562247/>
38. Pulst SM. The complex structure of ATXN2 genetic variation. *Neurol Genet*. 2018 Dec 1;4(6).
39. Daoud H, Belzil V, Martins S, Sabbagh M, Provencher P, Lacomblez L, et al. Association of Long ATXN2 CAG Repeat Sizes With Increased Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2011 Jun 13 [cited 2025 Feb 23];68(6):739–42. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/503411>
40. Ghahremani Nezhad H, Franklin JP, Alix JJP, Moll T, Pattrick M, Cooper-Knock J, et al. Simultaneous ALS and SCA2 associated with an intermediate-length ATXN2 CAG-repeat expansion. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* [Internet]. 2021 [cited 2025 Aug 15];22(7–8):579–82. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/21678421.2020.1853172>
41. Laffita-Mesa JM, Paucar M, Svenningsson P. Ataxin-2 gene: a powerful modulator of neurological disorders. *Curr Opin Neurol* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2025 Feb 23];34(4):578. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8279897/>
42. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* [Internet]. 2010 Aug 26 [cited 2020 Oct 28];466(7310):1069–75. Available from: [/pmc/articles/PMC2965417/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC2965417/?report=abstract)
43. Lee J, Kim M, Itoh TQ, Lim C. Ataxin-2: A versatile posttranscriptional regulator and its implication in neural function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2025 Feb 23];9(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29869836/>
44. Ross OA, Rutherford NJ, Baker M, Soto-Ortolaza AI, Carrasquillo MM, DeJesus-Hernandez M, et al. Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 [cited 2025 Feb 23];20(16):3207–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21610160/>
45. Pulst SM. The complex structure of ATXN2 genetic variation. *Neurol Genet*. 2018 Dec 1;4(6).
46. Boeynaems S, Dorone Y, Zhuang Y, Shabardina V, Huang G, Marian A, et al. Poly(A)-binding protein is an ataxin-2 chaperone that regulates biomolecular condensates. *Mol Cell* [Internet]. 2023 Jun 15 [cited 2025 Feb 23];83(12):2020-2034.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37295429/>
47. Marcelo A, Afonso IT, Afonso-Reis R, Brito DVC, Costa RG, Rosa A, et al. Autophagy in Spinocerebellar ataxia type 2, a dysregulated pathway, and a target for therapy. *Cell Death Dis* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Feb 23];12(12):1117. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8630050/>
48. Arsović A, Halbach MV, Canet-Pons J, Esen-Sehir D, Döring C, Freudenberg F, et al. Mouse Ataxin-2 Expansion Downregulates CamKII and Other Calcium Signaling Factors,

- Impairing Granule-Purkinje Neuron Synaptic Strength. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Sep 2 [cited 2025 Feb 23];21(18):1–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32932600/>
49. Magaña JJ, Velázquez-Pérez L, Cisneros B. Spinocerebellar ataxia type 2: clinical presentation, molecular mechanisms, and therapeutic perspectives. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2013 [cited 2025 Feb 23];47(1):90–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22996397/>
 50. Lastres-Becker I, Rüb U, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum*. 2008;7(2):115–24.
 51. Jing F, Yang D, Chen T. Advance in research on spinocerebellar ataxia 2. *Chinese Journal of Medical Genetics*. 2018 Apr 1;35(2):284–7.
 52. Wijegunawardana D, Nayak A, Vishal SS, Venkatesh N, Gopal PP. Ataxin-2 polyglutamine expansions aberrantly sequester TDP-43 ribonucleoprotein condensates disrupting mRNA transport and local translation in neurons. *Dev Cell* [Internet]. 2025 Jan 20 [cited 2025 Feb 23];60(2):253–269.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580724005720>
 53. Hart MP, Brettschneider J, Lee VMY, Trojanowski JQ, Gitler AD. Distinct TDP-43 pathology in ALS patients with ataxin 2 intermediate-length polyQ expansions. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2025 Feb 23];124(2):221. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3543833/>
 54. Borghero G, Pugliatti M, Marrosu F, Marrosu MG, Murru MR, Floris G, et al. Genetic architecture of ALS in Sardinia. *Neurobiol Aging*. 2014;35(12):2882.e7–2882.e12.
 55. Borghero G, Pugliatti M, Marrosu F, Marrosu MG, Murru MR, Floris G, et al. ATXN2 is a modifier of phenotype in ALS patients of Sardinian ancestry. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2025 Feb 24];36(10):2906.e1. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5193218/>
 56. Nunes Gonçalves JP, Leoni TB, Martins MP, Peluzzo TM, Dourado MET, Saute JAM, et al. Genetic epidemiology of familial ALS in Brazil. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2025 Feb 24];102:227.e1–227.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33618928/>
 57. Arsović A, Halbach MV, Canet-Pons J, Esen-Sehir D, Döring C, Freudenberg F, et al. Mouse Ataxin-2 Expansion Downregulates CamKII and Other Calcium Signaling Factors, Impairing Granule—Purkinje Neuron Synaptic Strength. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 6673 [Internet]. 2020 Sep 12 [cited 2025 Feb 23];21(18):6673. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6673/htm>
 58. Chiò A, Calvo A, Moglia C, Canosa A, Brunetti M, Barberis M, et al. ATXN2 polyQ intermediate repeats are a modifier of ALS survival. *Neurology* [Internet]. 2015 [cited 2025 Feb 24];84(3):251–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25527265/>
 59. Li L, Wang M, Huang L, Zheng X, Wang L, Miao H. Ataxin-2: a powerful RNA-binding protein. *Discover Oncology* 2024 15:1 [Internet]. 2024 Jul 22 [cited 2025 Feb

- 23];15(1):1–20. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12672-024-01158-y>
60. Song Rong S, Larson A, Wiggs JL. ATXN2 loss of function results in glaucoma-related features supporting a role for Ataxin-2 in primary open-angle glaucoma (POAG) pathogenesis. *Vision Res.* 2025 Jan 1;226:108508.
 61. Fittschen M, Lastres-Becker I, Halbach M V., Damrath E, Gispert S, Azizov M, et al. Genetic ablation of ataxin-2 increases several global translation factors in their transcript abundance but decreases translation rate. *Neurogenetics* [Internet]. 2015 Jul 20 [cited 2025 Feb 23];16(3):181. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4475250/>
 62. Kaehler C, Isensee J, Nonhoff U, Terrey M, Hucho T, Lehrach H, et al. Ataxin-2-Like Is a Regulator of Stress Granules and Processing Bodies. *PLoS One* [Internet]. 2012 Nov 27 [cited 2025 Feb 23];7(11):e50134. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3507954/>
 63. Marcelo A, Afonso IT, Afonso-Reis R, Brito DVC, Costa RG, Rosa A, et al. Autophagy in Spinocerebellar ataxia type 2, a dysregulated pathway, and a target for therapy. *Cell Death Dis* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Feb 23];12(12):1117. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8630050/>
 64. Tian Y, Heinsinger N, Hu Y, Lim UM, Wang Y, Fernandis AZ, et al. Deciphering the interactome of Ataxin-2 and TDP-43 in iPSC-derived neurons for potential ALS targets. *PLoS One* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Feb 23];19(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39739690/>
 65. Zeballos C MA, Moore HJ, Smith TJ, Powell JE, Ahsan NS, Zhang S, et al. Mitigating a TDP-43 proteinopathy by targeting ataxin-2 using RNA-targeting CRISPR effector proteins. *Nature Communications* 2023 14:1 [Internet]. 2023 Oct 14 [cited 2025 Feb 23];14(1):1–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-42147-z>
 66. Wijegunawardana D, Nayak A, Vishal SS, Venkatesh N, Gopal PP. Ataxin-2 polyglutamine expansions aberrantly sequester TDP-43 ribonucleoprotein condensates disrupting mRNA transport and local translation in neurons. *Dev Cell* [Internet]. 2025 Jan 20 [cited 2025 Feb 23];60(2):253-269.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580724005720>
 67. Scoles DR, Gandelman M, Paul S, Dexheimer T, Dansithong W, Figueroa KP, et al. A quantitative high-throughput screen identifies compounds that lower expression of the SCA2-and ALS-associated gene ATXN2. *J Biol Chem* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 Feb 24];298(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35787375/>
 68. Scoles DR, Meera P, Schneider MD, Paul S, Dansithong W, Figueroa KP, et al. Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2. *Nature* [Internet]. 2017 Apr 20 [cited 2025 Feb 24];544(7650):362–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28405024/>

69. Scoles D, Schneider M, Meera P, Figueroa K, Hung G, Rigo F, et al. Targeting ATXN2 Using Antisense Oligonucleotides as a Treatment for Spinocerebellar Ataxia Type 2 (SCA2) (S30.007). *Neurology*. 2016 Apr 5;86(16_supplement).
70. Nigri A, Sarro L, Mongelli A, Pinardi C, Porcu L, Castaldo A, et al. Progression of Cerebellar Atrophy in Spinocerebellar Ataxia Type 2 Gene Carriers: A Longitudinal MRI Study in Preclinical and Early Disease Stages. *Front Neurol* [Internet]. 2020 Dec 15 [cited 2025 Feb 24];11:616419. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33384659>
71. Mascalchi M, Vella A. Neuroimaging Biomarkers in SCA2 Gene Carriers. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2025 Feb 24];21(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32033120/>
72. Mascalchi M, Vella A. Neuroimaging Applications in Chronic Ataxias. *Int Rev Neurobiol*. 2018 Jan 1;143:109–62.
73. Turner MR, Grosskreutz J, Kassubek J, Abrahams S, Agosta F, Benatar M, et al. Towards a neuroimaging biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2011;10(5):400–3.
74. Menke RAL, Gray E, Lu CH, Kuhle J, Talbot K, Malaspina A, et al. CSF neurofilament light chain reflects corticospinal tract degeneration in ALS. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2015;2(7):748–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4531057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Benatar M, Boylan K, Jeromin A, Rutkove SB, Berry J, Atassi N, et al. ALS Biomarkers for Therapy Development: State of the Field & Future Directions. *Muscle Nerve* [Internet]. 2015;(February):169–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574709>
76. Risacher SL, Saykin AJ. Neuroimaging Biomarkers of Neurodegenerative Diseases and Dementia. *Semin Neurol* [Internet]. 2013 [cited 2025 Feb 24];33(4):386. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3975244/>
77. Filippi M, Agosta F, Grosskreutz J, Benatar M, Kassubek J, Verstraete E, et al. Progress towards a neuroimaging biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14(8):786–8.
78. Chio A, Pagani M, Agosta F, Calvo A, Cistaro A, Filippi M. Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *Lancet Neurol*. 2014;13(12):1228–40.
79. Magaña JJ, Velázquez-Pérez L, Cisneros B. Spinocerebellar ataxia type 2: Clinical presentation, molecular mechanisms, and therapeutic perspectives. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):90–104.
80. Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, García-Rodríguez JC, Almaguer-Mederos LE, Cruz-Mariño T, Laffita-Mesa JM. A comprehensive review of spinocerebellar ataxia type 2 in Cuba. *Cerebellum* [Internet]. 2011 Jun [cited 2025 Feb 24];10(2):184–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21399888/>

81. Scoles DR, Pulst SM. Spinocerebellar ataxia type 2. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1049:175–95.
82. Kim DH, Kim R, Lee JY, Lee KM. Clinical, Imaging, and Laboratory Markers of Premanifest Spinocerebellar Ataxia 1, 2, 3, and 6: A Systematic Review. *J Clin Neurol* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2025 Feb 24];17(2):187–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33835738>
83. Monte TL, Reckziegel EDR, Augustin MC, Locks-Coelho LD, Santos ASP, Furtado GV, et al. The progression rate of spinocerebellar ataxia type 2 changes with stage of disease. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2018 Jan 25 [cited 2025 Feb 24];13(1):1–8. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-017-0725-y>
84. Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N, Takashima H, Nomoto M. Three spinocerebellar ataxia type 2 siblings with ataxia, parkinsonism, and motor neuronopathy. *Internal Medicine*. 2011;50(13):1429–32.
85. Infante J, Berciano J, Volpini V, Corral J, Polo JM, Pascual J, et al. Spinocerebellar ataxia type 2 with levodopa-responsive parkinsonism culminating in motor neuron disease. *Movement Disorders*. 2004 Jul;19(7):848–52.
86. Braga-Neto P, Pedroso JL, Felício AC, Abrahão A, Dutra LA, Bezerra MLE, et al. SCA2 presenting as an ataxia-parkinsonism-motor neuron disease syndrome. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2011 [cited 2025 Feb 24];69(2B):404–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21625775/>
87. Cheng N, Wied HM, Gaul JJ, Doyle LE, Reich SG. SCA2 presenting as a focal dystonia. *J Clin Mov Disord* [Internet]. 2018 Dec 13 [cited 2025 Feb 24];5(1):1–5. Available from: <https://clinicalmovementdisorders.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40734-018-0073-7>
88. Jhunjhunwala K, Netravathi M, Purushottam M, Jain S, Pal PK. Profile of extrapyramidal manifestations in 85 patients with spinocerebellar ataxia type 1, 2 and 3. *J Clin Neurosci*. 2014;6(6):1002–6.
89. Bezerra MLE, Pedroso JL, Braga-Neto P, Abrahao A, de Albuquerque MVC, Borges FRP, et al. Pattern of Peripheral Nerve Involvement in Spinocerebellar Ataxia Type 2: a Neurophysiological Assessment. *Cerebellum* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2025 Feb 24];15(6):767–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26708559/>
90. Linnemann C, Tezenas du Montcel S, Rakowicz M, Schmitz-Hübsch T, Szymanski S, Berciano J, et al. Peripheral Neuropathy in Spinocerebellar Ataxia Type 1, 2, 3, and 6. *Cerebellum* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2025 Feb 24];15(2):165–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26054379/>
91. De Joanna G, De Rosa A, Salvatore E, Castaldo I, De Luca N, Izzo R, et al. Autonomic nervous system abnormalities in spinocerebellar ataxia type 2: A cardiovascular neurophysiologic study. *J Neurol Sci*. 2008 Dec 15;275(1–2):60–3.
92. Tuin I, Voss U, Kang JS, Kessler K, Rüb U, Nolte D, et al. Stages of sleep pathology in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Neurology*. 2006 Dec;67(11):1966–72.

93. Velázquez-Pérez L, Voss U, Rodríguez-Labrada R, Auburger G, Canales Ochoa N, Sánchez Cruz G, et al. Sleep disorders in spinocerebellar ataxia type 2 patients. *Neurodegener Dis* [Internet]. 2011 Jul [cited 2025 Feb 24];8(6):447–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21494015/>
94. Bürk K, Globas C, Bösch S, Klockgether T, Zühlke C, Daum I, et al. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *J Neurol*. 2003 Feb 1;250(2):207–11.
95. Bürk K, Globas C, Bösch S, Gräber S, Abele M, Brice A, et al. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia 2. *Brain* [Internet]. 1999 Apr [cited 2025 Feb 24];122 (Pt 4)(4):769–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10219787/>
96. Chougar L, Coarelli G, Lejeune FX, Ziegner P, Gaurav R, Biondetti E, et al. Substantia nigra degeneration in spinocerebellar ataxia 2 and 7 using neuromelanin-sensitive imaging. *Eur J Neurol* [Internet]. 2025 Jan 1 [cited 2025 Feb 24];32(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39757380/>
97. Egorova PA, Zakharova OA, Vlasova OL, Bezprozvanny IB. In vivo analysis of cerebellar Purkinje cell activity in SCA2 transgenic mouse model. *J Neurophysiol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2025 Feb 24];115(6):2840. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4922606/>
98. Álvarez-Paradelo S, García A, Infante J, Berciano J. Multimodal neurophysiological study of SCA2 and SCA3 autosomal dominant hereditary spinocerebellar ataxias. *Neurología (English Edition)*. 2011 Jan 1;26(3):157–65.
99. Antenora A, Rinaldi C, Roca A, Pane C, Lieto M, Saccà F, et al. The Multiple Faces of Spinocerebellar Ataxia type 2. Vol. 4, *Annals of Clinical and Translational Neurology*. Wiley-Blackwell; 2017. p. 687–95.
100. Pulst SM. Spinocerebellar Ataxia Type 2: A Review and Personal Perspective. *Neurol Genet*. 2025 Jan 27;11(1).
101. Milne SC, Corben LA, Roberts M, Szmulewicz D, Burns J, Grobler AC, et al. Rehabilitation for ataxia study: Protocol for a randomised controlled trial of an outpatient and supported home-based physiotherapy programme for people with hereditary cerebellar ataxia. *BMJ Open*. 2020 Dec 17;10(12).
102. Chien HF, Zonta MB, Chen J, Diaferia G, Viana CF, Teive HAG, et al. Rehabilitation in patients with cerebellar ataxias. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2022 [cited 2025 Feb 24];80(3):306. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9648943/>
103. Coarelli G, Heinzmann A, Ewencyk C, Fischer C, Chupin M, Monin ML, et al. Safety and efficacy of riluzole in spinocerebellar ataxia type 2 in France (ATRIL): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2025 Feb 24];21(3):225–33. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S1474442221004579>
104. Cui ZT, Mao ZT, Yang R, Li JJ, Jia SS, Zhao JL, et al. Spinocerebellar ataxias: from pathogenesis to recent therapeutic advances. *Front Neurosci*. 2024 Jun 4;18:1422442.

105. Vázquez-Mojena Y, León-Arcia K, González-Zaldivar Y, Rodríguez-Labrada R, Velázquez-Pérez L. Gene Therapy for Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: Advances, Challenges, and Perspectives. *Mov Disord* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Feb 24];36(12):2731–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34628681/>
106. Riess O, Rüß U, Rüß R, Pastore A, Bauer P, Schoßls L, et al. SCA3: Neurological features, pathogenesis and animal models.
107. Rizea RE, Corlatescu AD, Costin HP, Dumitru A, Ciurea AV. Understanding Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Advances. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol 25, Page 9966 [Internet]. 2024 Sep 15 [cited 2025 Feb 24];25(18):9966. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/18/9966/htm>
108. Eisen A, Vucic S, Mitsumoto H. History of ALS and the competing theories on pathogenesis: IFCN handbook chapter. *Clin Neurophysiol Pract* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2025 Feb 24];9:1. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10776891/>
109. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2013;9(11):617–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126629>
110. Wang H, Guan LP, Deng M. Recent progress of the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and challenges of gene therapy. *Front Neurosci*. 2023 May 12;17:1170996.
111. Vajda A, McLaughlin RL, Heverin M, Thorpe O, Abrahams S, Al-Chalabi A, et al. Genetic testing in ALS: A survey of current practices. *Neurology*. 2017 Mar 7;88(10):991–9.
112. Chadi G, Maximino JR, Jorge FM de H, Borba FC de, Gilio JM, Callegaro D, et al. Genetic analysis of patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis in a Brazilian Research Center. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017 Apr 3;18(3–4):249–55.
113. Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):118–30.
114. Tavares de Andrade HM, Cintra VP, de Albuquerque M, Piccinin CC, Bonadia LC, Duarte Couteiro RE, et al. Intermediate-length CAG repeat in ATXN2 is associated with increased risk for amyotrophic lateral sclerosis in Brazilian patients. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2025 Feb 24];69:292.e15–292.e18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29934271/>
115. Sproviero W, Shatunov A, Stahl D, Shoai M, van Rheenen W, Jones AR, et al. ATXN2 trinucleotide repeat length correlates with risk of ALS. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2025 Aug 15];51:178.e1. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5302215/>
116. Tan RH, Kril JJ, McGinley C, Hassani M, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, et al. Cerebellar neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis cases with ATXN2 intermediate

- repeat expansions. *Ann Neurol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2025 Aug 15];79(2):295–305. Available from: [/doi/pdf/10.1002/ana.24565](https://doi/pdf/10.1002/ana.24565)
117. Liu X, Lu M, Tang L, Zhang N, Chui D, Fan D. ATXN2 CAG repeat expansions increase the risk for Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2013 [cited 2025 Aug 15];34(9):2236.e5–2236.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23635656/>
 118. Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 [cited 2025 Aug 15];20(9):1697–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292779/>
 119. Lahut S, Ömür Ö, Uyan Ö, Ağim ZS, Özoğuz A, Parman Y, et al. ATXN2 and its neighbouring gene SH2B3 are associated with increased ALS risk in the Turkish population. *PLoS One* [Internet]. 2012 Aug 20 [cited 2025 Aug 15];7(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22916186/>
 120. Conforti FL, Spataro R, Sproviero W, Mazzei R, Cavalcanti F, Condino F, et al. Ataxin-1 and ataxin-2 intermediate-length polyQ expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2012 Dec 11 [cited 2025 Aug 16];79(24):2315–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23197749/>
 121. Lu HP, Gan SR, Chen S, Li HF, Liu ZJ, Ni W, et al. Intermediate-length polyglutamine in ATXN2 is a possible risk factor among Eastern Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2025 Aug 16];36(3):1603.e11–1603.e14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25457026/>
 122. Neuenschwander AG, Thai KK, Figueroa KP, Pulst SM. Amyotrophic lateral sclerosis risk for spinocerebellar ataxia type 2 ATXN2 CAG repeat alleles: A meta-analysis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2025 Aug 16];71(12):1529–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25285812/>
 123. Fischbeck KH, Pulst SM. Amyotrophic lateral sclerosis and spinocerebellar ataxia 2. *Neurology* [Internet]. 2011 Jun 14 [cited 2025 Feb 24];76(24):2050–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562249>
 124. Vidovic M, Müschen LH, Brakemeier S, Machetanz G, Naumann M, Castro-Gomez S. Current State and Future Directions in the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Feb 24];12(5):736. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10000757/>
 125. de Carvalho M, Chio A, Dengler R, Hecht M, Weber M, Swash M. Neurophysiological measures in amyotrophic lateral sclerosis: Markers of progression in clinical trials. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 2005 Mar;6(1):17–28.
 126. de Carvalho M, Swash M. Lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clinical Neurophysiology*. 2016 Jul 1;127(7):2670–81.

127. Eisen A, Swash M. Clinical neurophysiology of ALS. *Clin Neurophysiol* [Internet]. 2001 [cited 2025 Feb 24];112(12):2190–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11738189/>
128. Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Preux PM, Marin B. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev Neurol (Paris)* [Internet]. 2015;172(1):37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2015.11.002>
129. Glass JD, Dewan R, Ding J, Gibbs JR, Dalgard C, Keagle PJ, et al. ATXN2 intermediate expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2022 Aug 1;145(8):2671–6.
130. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2001 Apr 22 [cited 2025 Feb 24];(4):CD001447. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687111>
131. Saitoh Y, Takahashi Y. Riluzole for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis Manag* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 Feb 24];10(6):343–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32847483/>
132. Brooks BR, Berry JD, Ciepielewska M, Liu Y, Zambrano GS, Zhang J, et al. Intravenous edaravone treatment in ALS and survival: An exploratory, retrospective, administrative claims analysis. *EClinicalMedicine* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2025 Feb 24];52:101590. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S2589537022003200>
133. Martinez G V. Introduction to MRI physics. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1718:3–19.
134. Price RR. The AAPM/RSNA physics tutorial for residents: MR imaging safety considerations. *Radiographics*. 1999;19(6):1641–51.
135. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage* [Internet]. 2000 [cited 2025 Feb 24];11(6 Pt 1):805–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10860804/>
136. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion Tensor Imaging of the Brain. *Neurotherapeutics*. 2007 Jul 1;4(3):316–29.
137. Baek SH, Park J, Kim YH, Seok HY, Oh KW, Kim HJ, et al. Usefulness of diffusion tensor imaging findings as biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports* 2020 10:1 [Internet]. 2020 Mar 23 [cited 2025 Feb 24];10(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-62049-0>
138. Tae WS, Ham BJ, Pyun SB, Kang SH, Kim BJ. Current clinical applications of diffusion-tensor imaging in neurological disorders. *J Clin Neurol*. 2018 Apr 1;14(2):129–40.
139. Zejlou C, Nakhostin D, Winkelhofer S, Pangalu A, Kulcsar Z, Lewandowski S, et al. Structural magnetic resonance imaging findings and histopathological correlations in motor neuron diseases-A systematic review and meta-analysis. *Front Neurol* [Internet]. 2022 Aug 30 [cited 2025 Feb 24];13:947347. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36110394>

140. Cannon AE, Zürrer WE, Zejlou C, Kulcsar Z, Lewandowski S, Piehl F, et al. Neuroimaging findings in preclinical amyotrophic lateral sclerosis models-How well do they mimic the clinical phenotype? A systematic review. *Front Vet Sci* [Internet]. 2023 [cited 2025 Feb 24];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37205225/>
141. Kalra S. Magnetic Resonance Spectroscopy in ALS. *Front Neurol* [Internet]. 2019 [cited 2025 Feb 24];10(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31133975/>
142. Foerster BR, Pomper MG, Callaghan BC, Petrou M, Edden RAE, Mohamed MA, et al. 3T MR Spectroscopy Reveals an Imbalance between Excitatory and Inhibitory Neurotransmitters in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2013 [cited 2025 Feb 24];70(8):1009. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4382938/>
143. Mascalchi M, Vella A. Neuroimaging Applications in Chronic Ataxias. *Int Rev Neurobiol*. 2018 Jan 1;143:109–62.
144. Dickerson BC, Agosta F, Filippi M. fMRI in Neurodegenerative Diseases: From Scientific Insights to Clinical Applications. *Neuromethods* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2025 Feb 24];119:699–739. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-5611-1_23
145. Abidi M, Pradat PF, Termoz N, Couillandre A, Bede P, de Marco G. Motor imagery in amyotrophic lateral Sclerosis: An fMRI study of postural control. *Neuroimage Clin*. 2022 Jan 1;35:103051.
146. Abidi M, de Marco G, Couillandre A, Feron M, Mseddi E, Termoz N, et al. Adaptive functional reorganization in amyotrophic lateral sclerosis: coexisting degenerative and compensatory changes. *Eur J Neurol*. 2020 Jan 1;27(1):121–8.
147. Hernandez-Castillo CR, Galvez V, Mercadillo RE, Díaz R, Yescas P, Martinez L, et al. Functional connectivity changes related to cognitive and motor performance in spinocerebellar ataxia type 2. *Mov Disord* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2025 Feb 24];30(10):1391–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26256273/>
148. Cistaro A, Cuccurullo V, Quartuccio N, Pagani M, Valentini MC, Mansi L. Role of PET and SPECT in the Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2025 Feb 24];2014:237437. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4004117/>
149. Braga-Neto P, Godeiro-Junior C, Dutra LA, Pedroso JL, Barsottini OGP. Translation and validation into Brazilian version of the Scale of the Assessment and Rating of Ataxia (SARA). *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2010 [cited 2025 Aug 16];68(2):228–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20464290/>
150. Guedes K, Pereira C, Pavan K, Valério BCO. Cross-cultural adaptation and validation of ALS Functional Rating Scale-Revised in Portuguese language. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2010 [cited 2025 Aug 16];68(1):44–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20339651/>
151. de Albuquerque M, Branco LMT, Rezende TJR, de Andrade HMT, Nucci A, França MC. Longitudinal evaluation of cerebral and spinal cord damage in Amyotrophic Lateral

- Sclerosis. *Neuroimage Clin* [Internet]. 2017 [cited 2020 Oct 28];14:269–76. Available from: [/pmc/articles/PMC5294732/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33576112/)
152. Servelhere KR, Rezende TJR, de Lima FD, de Brito MR, de França Nunes RF, Casseb RF, et al. Brain Damage and Gene Expression Across Hereditary Spastic Paraplegia Subtypes. *Movement Disorders* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 Aug 16];36(7):1644–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33576112/>
 153. Junqueira T, Rezende R, Adanyaguh I, Barsottini OGP, Bender B, Cendes F, et al. Genotype-specific spinal cord damage in spinocerebellar ataxias: an ENIGMA-Ataxia study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2024 [cited 2024 Apr 6];0:1–9. Available from: <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>
 154. Henschel L, Conjeti S, Estrada S, Diers K, Fischl B, Reuter M. FastSurfer - A fast and accurate deep learning based neuroimaging pipeline. *Neuroimage* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2025 Aug 16];219:117012. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811920304985>
 155. Fischl B. FreeSurfer. *Neuroimage* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2025 Aug 16];62(2):774. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22705271/>
 156. De Leener B, Lévy S, Dupont SM, Fonov VS, Stikov N, Louis Collins D, et al. SCT: Spinal Cord Toolbox, an open-source software for processing spinal cord MRI data. *Neuroimage* [Internet]. 2017 Jan 15 [cited 2024 Apr 6];145(Pt A):24–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27720818/>
 157. Faber J, Kügler D, Bahrami E, Heinz LS, Timmann D, Ernst TM, et al. CerebNet: A fast and reliable deep-learning pipeline for detailed cerebellum sub-segmentation. *Neuroimage* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Aug 16];264. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36349595/>
 158. Sunkin SM, Ng L, Lau C, Dolbeare T, Gilbert TL, Thompson CL, et al. Allen Brain Atlas: An integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2020 Oct 28];41(D1):D996. Available from: [/pmc/articles/PMC3531093/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23443852/)
 159. Rittman T, Rubinov M, Vértés PE, Patel AX, Ginestet CE, Ghosh BCP, et al. Regional expression of the MAPT gene is associated with loss of hubs in brain networks and cognitive impairment in Parkinson disease and progressive supranuclear palsy. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2025 Aug 16];48:153–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27697694/>
 160. Ishida C, Komai K, Yonezawa K, Sakajiri K ichi, Nitta E, Kawashima A, et al. An autopsy case of an aged patient with spinocerebellar ataxia type 2. *Neuropathology* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2025 Jul 5];31(5):510–8. Available from: [/doi/pdf/10.1111/j.1440-1789.2010.01176.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2010.01176.x)
 161. Rezende TJR, de Paiva JLR, Martinez ARM, Lopes-Cendes I, Pedroso JL, Barsottini OGP, et al. Structural signature of SCA3: From presymptomatic to late disease stages. *Ann Neurol* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Apr 7];84(3):401–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30014526/>

162. Mandelli ML, De Simone T, Minati L, Bruzzone MG, Mariotti C, Fancellu R, et al. Diffusion Tensor Imaging of Spinocerebellar Ataxias Types 1 and 2. *American Journal of Neuroradiology* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2017 Oct 16];28(10):1996–2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998418>
163. Xu J, Shimony JS, Klawiter EC, Snyder AZ, Trinkaus K, Naismith RT, et al. Improved in vivo diffusion tensor imaging of human cervical spinal cord. *Neuroimage* [Internet]. 2013 Feb 2 [cited 2024 Apr 6];67:64. Available from: [/pmc/articles/PMC3604900/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23444444/)
164. Song SK, Sun SW, Ju WK, Lin SJ, Cross AH, Neufeld AH. Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *Neuroimage* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2025 Jul 5];20(3):1714–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811903004403?via%3Dihub>
165. Song SK, Yoshino J, Le TQ, Lin SJ, Sun SW, Cross AH, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* [Internet]. 2005 May 15 [cited 2025 Jul 5];26(1):132–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811905000224?via%3Dihub>
166. Braga-Neto P, Godeiro-Junior C, Dutra LA, Pedroso JL, Barsottini OGP. Translation and validation into Brazilian version of the Scale of the Assessment and Rating of Ataxia (SARA). *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2010 [cited 2025 Jul 5];68(2):228–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20464290/>
167. Li H, Zhang Q, Duan Q, Jin J, Hu F, Dang J, et al. Brainstem Involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Combined Structural and Diffusion Tensor MRI Analysis. *Front Neurosci* [Internet]. 2021 Jun 2 [cited 2025 Jul 5];15:675444. Available from: www.frontiersin.org

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1: Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO LONGITUDINAL CLÍNICO E DE NEUROIMAGEM EM PACIENTES E INDIVÍDUOS SOB RISCO DE DOENÇAS HEREDODEGENERATIVAS TARDIAS

Pesquisador: Marcondes Cavalcante França Junior

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 83241318.3.1001.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.544.660

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

Introdução:

Introdução Doenças heredodegenerativas:

Doenças neurodegenerativas são doenças neurológicas heterogêneas que podem envolver demência, doenças do neurônio motor e distúrbios do movimento. Nessas doenças há destruição progressiva e irreversível de neurônios e gradativamente o paciente perde suas funções motoras, fisiológicas e/ou sua capacidade cognitiva. Essas doenças podem cursar com síndrome demencial como manifestação clínica principal, com síndrome demencial associada a distúrbios do movimento ou exclusivamente com distúrbios do movimento. Entre elas existem as Ataxias, Doença de Huntington, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica e outras. As doenças heredodegenerativas constituem um grupo amplo e prevalente de enfermidades crônicas caracterizadas: 1. Pela morte prematura e acelerada de populações neuronais tanto no sistema nervoso central quanto periférico, e 2. Pelo substrato genético. Podem se manifestar tanto na

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

infância quanto na vida adulta, mas invariavelmente tem curso progressivo culminando com grave debilidade motora e/ou cognitiva após alguns anos de doença. Em conjunto, a prevalência deste grupo de doenças supera 20 casos a cada 100.000 habitantes (Ruano et al, 2014; Pringsheim T et al, 2012; Valdmánis & Rouleau, 2008). Do ponto de vista genético, estas doenças podem ter padrão de herança autossômico recessiva (AR), autossômico dominante (AD), ligado ao X ou mitocondrial. As formas de início tardio, na vida adulta, frequentemente segregam como traços AD, enquanto que as formas AR ou ligadas ao X tendem a se apresentar mais precocemente. Em relação ao fenótipo, há extrema variabilidade dentro do grupo. Existem enfermidades com apresentação predominante ou exclusiva de natureza cognitiva – como as formas familiares da doença de Alzheimer e da demência frontotemporal. Na prática, a grande maioria das doenças hereditárias tem como principal manifestação o comprometimento motor. Este pode se expressar através de fraqueza muscular, amiotrofia, espasticidade, tremor, rigidez, distonia e ataxia, que podem vir de forma isolada ou combinadas em um mesmo paciente. Dentro da via motora, o sítio de comprometimento pode se estender do sistema nervoso periférico ao córtex cerebral. O foco deste projeto recairá sobre 3 das principais formas de doenças hereditárias motoras, que serão discutidas a seguir: a Esclerose lateral amiotrófica familiar (FALS), as paraparesias espásticas hereditárias (PEH) e as ataxias espinocerebelares (SCA). 1- Esclerose lateral amiotrófica familiar (FALS): A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é a principal representante das DNM neurodegenerativas e a mais relevante de todas as DNM, sobretudo em populações adultas (Kiernan et al, 2011). É uma condição devastadora caracterizada por perda de força progressiva, que se dissemina para todas as regiões do corpo, sendo acompanhada por atrofia muscular generalizada, fasciculações e câimbras. Em média, os pacientes vão a óbito cerca de 3 anos após os primeiros sintomas, em virtude de insuficiência respiratória ou de complicações relacionadas à disfagia (Kiernan et al, 2011). Cerca de 10% dos casos de ELA têm um substrato genético; essas formas são chamadas de ELA familiar (FALS) e já existem pelo menos 14 loci e/ou genes identificados (Chia et al, 2018). A grande maioria dos pacientes, entretanto, surge de forma esporádica, sem recorrência familiar (ELA esporádica). Os mecanismos subjacentes à ELA, especialmente na forma esporádica, ainda não estão completamente elucidados e por isso, não dispomos de tratamentos capazes de alterar significativamente a história natural desta grave enfermidade. Dentre as alterações mais conhecidas nos pacientes com FALS, temos as mutações nos genes SOD1 (codifica a enzima superóxido dismutase), TARDBP (ou TDP-43 que codifica a proteína de ligação TAR DNA, alterando expressão e regulação gênica, processamento de mRNA e regulação do RNA), FUS (codifica a proteína de fusão no sarcoma, exibindo mesmas funções

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

alteradas do gene anterior) e ANG (codifica angiogenina, ribonuclease, família da RNase A, regulando a transcrição de RNA). Dentre estes, a FALS relacionada a mutações no gene SOD1 tem maior prevalência, correspondendo a 20% dos casos na Europa/USA (Chia et al, 2018). Recentemente ganhou destaque o gene C9orf72 no contexto da FALS (De Jesus-Hernandez et al, 2011). A repetição de um hexanucleotídeo GGGGCC em uma região não codificadora deste gene foi descrita como a causa mais frequente não apenas de FALS, mas também de demência fronto temporal familiar. As mutações no gene C9orf72 correspondem a 34.2% dos casos de FALS e 5.9% dos casos esporádicos (Majounie et al, 2012). Supõe-se que essa alteração gere um mecanismo que favorece um ganho de função tóxica ao RNA. Tal mutação leva a doença de herança classicamente AD. No Brasil, outro gene que merece destaque no contexto da FALS é o VAPB (Nishimura et al, 2004). Uma mutação misense p.Pro56Ser foi identificada em famílias brasileiras segregando quadros tanto de FALS quanto de amiotrofia espinhal distal com padrão de herança AD. Recentemente, este gene foi reportado como a causa mais frequente de FALS em coorte de pacientes do estado de São Paulo (Chadi et al, 2017).

2- PARAPARESIA ESPÁSTICA FAMILIAR (PEH) As paraparesias espásticas hereditárias (PEHs) compõem um grupo heterogêneo de condições que compartilham a presença de espasticidade e fraqueza dos membros inferiores como manifestação predominante. O substrato anatômico de tal manifestação consiste na degeneração das porções mais distais em um padrão comprimento-dependente dos axônios que compõem o trato corticoespinhal (TCE) (Faber et al, 2014). Do ponto de vista genético, as PEH são transmitidas por todas as formas de herança mendeliana, podendo segregar de maneira autossômica dominante (AD), autossômica recessiva (AR) ou ligada ao X, também havendo casos de herança mitocondrial. As PEHs estão entre as desordens mais heterogêneas da neurologia. Tal heterogeneidade é tanto genética, em que são conhecidos atualmente mais de 80 genes ou loci gênicos relacionados, quanto clínica, com apresentações clínicas variadas produzidas por mutações em um mesmo gene, o que dificulta o adequado diagnóstico. Com base no fenótipo, as PEHs são subdivididas em formas puras ou complicadas. No primeiro caso os pacientes afetados apresentam sinais e sintomas de liberação piramidal associados ou não à disfunção esfinteriana e de funículos posteriores da medula. Já nas formas complicadas os achados de liberação piramidal são acompanhados de outras manifestações neurológicas como epilepsia, comprometimento cognitivo, distúrbios do movimento, entre outros. Apesar do grande número de genes potencialmente causadores de PEH, estes estão envolvidos com um pequeno grupo de funções celulares que convergem para disfunção dos prolongamentos distais dos tratos piramidais. Os componentes requeridos para adequado funcionamento dos longos axônios que compõem o TCE,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

tais como proteínas, lipídeos e organelas, produzidos na região do corpo celular, precisam ser transportados ao longo destas que são as células longitudinalmente mais extensas do corpo humano. A disfunção no transporte intracelular de substâncias constitui determinante fundamental da PEH, levando aos sinais e sintomas que resultam essencialmente da perda de conectividade entre o primeiro e o segundo neurônio motor. As formas de herança AD representam até 80% dos casos de PEH em países da Europa e América do Norte (Ruano et al, 2014). O fenótipo puro é o mais encontrado, sendo o gene SPAST/SPG4 responsável por até 60% dos casos dominantes e 12% dos casos esporádicos (França Jr et al, 2014). O início dos sintomas é em média aos 30 anos, mas há casos de início na infância e em idosos, com heterogeneidade intrafamiliar. Dentre as formas recessivas, merecem destaque por sua frequência os subtipos ligados aos genes SPG7 e SPG11 (ou KIAA1840). Na PEH-SPG7 – que é forma AR mais comum de início no adulto – o quadro é frequentemente acompanhado de ataxia cerebelar e anormalidades oculares como: ptose, oftalmoplegia externa, paresia supranuclear do olhar vertical e atrofia óptica (Klebe et al, 2012). A PEH-SPG11 é a forma mais AR mais frequente de início na infância. Tipicamente é uma forma complicada associada à disfunção cognitiva e corpo caloso fino visto à neuroimagem (Stevanin et al, 2007). A disfunção de marcha inicia-se em média aos 15 anos, mas é frequente um histórico prévio de dificuldade escolar e alterações sutis de marcha (andar nas pontas dos pés ou quedas frequentes).

3- ATAXIAS ESPINOCEREBELARES (SCA): As ataxias espinocerebelares tem um padrão de herança AD e já se conhecem mais de 40 subtipos genéticos da doença (SCAs 1-43) (Depondt et al, 2016). Elas constituem um grupo de doenças cuja manifestação central é a perda de coordenação e equilíbrio por dano ao cerebelo e/ou conexões – ou seja, ataxia (Schols et al, 2004). O curso das SCAs é lentamente progressivo, culminando com incapacidade de marcha, disfagia, disartria nas fases mais avançadas. As SCAs são enfermidades de início habitualmente no adulto jovem, mas existe grande variação com casos de início infantil e até no idoso (>65 anos). Em média, os pacientes sobrevivem de 15 a 20 anos após os primeiros sintomas e o óbito sobrevém devido a complicações como pneumonia aspirativa ou traumatismos crânio-encefálicos (Kieling et al, 2007). Além da ataxia, diversos outros tipos de manifestações motoras e não-motoras são encontrados nos pacientes com SCA. Parkinsonismo, distonia, tremores, espasticidade e neuropatia periférica são frequentes em pacientes com SCA1, 2, 3 e 17, por exemplo (Schols et al, 2004). Na SCA7, um achado típico associado ao quadro é a perda visual devido à degeneração de cones/bastonetes na retina. Algumas formas tem uma apresentação exclusiva de ataxia e por isso, a evolução tende a ser mais favorável, como no caso da SCA6. Do ponto de vista genético, uma parcela expressiva das SCAs tem como causa expansões anormais do trinucleotídeo CAG em

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

regiões codificantes de determinados genes (exons). Neste caso, a alteração genética leva a produção de uma cadeia anormalmente longa de poligutaminas (o tripleto CAG codifica o aminoácido glutamina). Por isso, esse grupo é também conhecido como doenças por poliglutaminas (PolyQ disorders) (Everett & Wood, 2004). Fazem parte deste grupo a SCA1, 2, 3, 6, 7, 17 e uma condição assemelhada, a atrofia dentato-pálido-rubro-luisiana (DRPLA). Neste subgrupo de SCAs, existe uma correlação clara, mas imprecisa entre o tamanho da expansão e a expressão clínica da doença, em particular no que se refere à idade de início dos sintomas (van de Warrenburg et al, 2005). Paralelamente, sabe-se que as expansões anormais têm uma tendência de sofrer aumento progressivo de tamanho a cada nova meiose. Esses dois aspectos explicam o fenômeno clínico, que é próprio delas, chamado de antecipação - o início progressivamente mais precoce e com maior gravidade ao longo das gerações sucessivas. Dentre as SCAs, a doença de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelar tipo 3 ou SCA3) é a forma mais comum globalmente, e particularmente nos países com colonização portuguesa. No Brasil, a SCA3 corresponde a quase 70% de todas as ataxias hereditárias (Lopes-Cendes et al, 1997). Outras formas também descritas em nosso país e que tem frequência relevante são SCA1, SCA2, SCA6 (sobretudo em descendentes de japoneses) e SCA10 (na região sul do Brasil) (de Castilhos et al, 2014). PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS: limitações existentes As doenças hereditárias degenerativas abordadas acima – FALS, PEH e SCAs - constituem um desafio terapêutico para o neurologista ainda nos dias de hoje. Existem apenas duas drogas aprovadas pelo FDA para o tratamento da FALS (Riluzole e Edaravone), mas ambas com efeito paliativo e bastante discreto (prolongam a sobrevida em 2 a 3 meses) (Writing group, Lancet Neurol 2017). Para pacientes com PEH e SCAs não há nenhum tipo de intervenção comprovadamente eficaz. Mesmo terapias sintomáticas são implementadas com base em evidências circunstanciais. Na medida em se avolumam os conhecimentos sobre a biologia destas doenças, novos alvos terapêuticos vêm sendo identificados e drogas eficazes podem surgir. Algumas destas moléculas candidatas se encontram em fase de testes pré-clínicos e outras até em ensaios de fase 1 -2 (Schols et al, 2017; Miller et al, 2013). A despeito disso, uma grande limitação existente nos programas clínicos de desenvolvimento de novos tratamentos é a carência de dados sobre a história natural destas enfermidades e sobre potenciais biomarcadores. Para o desenho de ensaios clínicos, especificamente, é de fundamental importância saber qual a taxa de progressão destas doenças para que se possa estimar qual o número de pacientes e qual tempo de seguimento serão necessários em cada um dos braços do estudo (placebo x droga). No caso das PEH e das SCAs, que tem evolução extremamente lenta, a quantificação da deterioração baseada apenas em escalas clínicas se mostra pouco sensível (variação anual < 1%) (Jacobi et al,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

2015; Tezenas du Montcel et al, 2012). Assim, tomando por base este tipo de parâmetro, para a confecção de ensaios clínicos seriam necessárias coortes extremamente grandes e com um tempo de seguimento muito longo (2 anos) para avaliação de potenciais efeitos terapêuticos (Saute et al, 2015). No contexto de doenças raras, como é o caso, isto tomaria praticamente inviável a execução deste tipo de teste terapêutico. Por isso, há necessidade de novos biomarcadores que se mostrem mais sensíveis (ie, tenham maior variação ao longo do tempo) para rastrear a progressão destas doenças, facilitando assim o desenho dos ensaios clínicos. Dentre os potenciais biomarcadores estudados, a neuroimagem baseada na ressonância magnética tem destaque (Klaes et al, 2016). As modernas técnicas de análise permitem documentar e quantificar in vivo as alterações estruturais e funcionais do sistema nervoso central. Atualmente, dispomos de ferramentas robustas para medir, por exemplo, espessura de regiões corticais, volume de núcleos profundos e cerebelo, integridade microestrutural de fascículos dentro da substância branca, e área de secção transversa da medula espinhal (Klaes et al, 2016; de Albuquerque et al, 2017). No contexto das doenças de interesse deste projeto, portanto, temos a capacidade de investigar de modo abrangente as principais estruturas afetadas, caso do cerebelo (nas SCAs) e as vias motoras piramidais (nas PEH e FALS). Na verdade, existe um conjunto de publicações disponíveis nesta área, que reforça o grande potencial da neuroimagem quantitativa como biomarcador (de Albuquerque et al, 2017; Agosta et al, 2015; D'Abreu A et al, 2009). Entretanto, há uma grande carência de estudos com desenho longitudinal, o que representa uma enorme limitação quando vislumbramos a aplicação no contexto de ensaios clínicos (de Albuquerque et al, 2017). Outro aspecto que tem recebido muito interesse recentemente é a avaliação de indivíduos pré-sintomáticos. Dados anatomopatológicos e de imagem indicam que quando os pacientes manifestam os primeiros sintomas, já houve uma perda maciça de neurônios (Jacobi et al, 2013). Portanto, a instituição de tratamento nesta fase seria tardia e teria chance reduzida de produzir algum benefício clínico. Assim, o foco de investigação tem recaído sobre indivíduos sob risco – como por exemplo, filhos ou irmãos assintomáticos de pacientes. Dados recentes sugerem que nestas doenças existe um período pré-sintomático em que há dano neuronal passível de detecção através de neuroimagem ou outros biomarcadores, mas ainda sem produzir sintomas clínicos (Jacobi et al, 2013; Floeter et al, 2017). Este seria o momento ideal para se iniciar e testar novos potenciais tratamentos. Portanto, há necessidade de se investigar esta população de indivíduos portadores de mutação, mas ainda numa fase assintomática, com o intuito de determinar quanto dura esta fase pré-clínica, por onde começam os danos e sobretudo, como é a progressão. Curiosamente, ainda há muito poucos estudos voltados para isto notadamente explorando a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

correlação entre exame clínico-neurológico e neuroimagem.

Hipótese:

Com uma observação longitudinal e indivíduos em risco e afetados para comparação, espera-se poder observar como e quando iniciam as alterações estruturais no cérebro, antes do aparecimento dos sintomas. Assim, será possível implementar novos estudos buscando um diagnóstico e condutas mais precoces para essas doenças neurodegenerativas de início tardio.

Metodologia Proposta:

Propomos aqui um estudo amplo voltado para a caracterização clínica e de imagem na FALS, PEH e SCA. Em especial, focado na identificação de possíveis biomarcadores e para a determinação da história natural de cada uma das enfermidades, pontos fundamentais para o desenho de ensaios clínicos. No estudo realizado com os pacientes (indivíduos sintomáticos), o foco recairá na identificação das áreas/estruturas danificadas em cada um dos subtipos de FALS, PEH e SCA; no padrão de progressão deste dano ao longo do tempo; e na correlação com a deterioração clínica. No estudo realizado com os indivíduos sob risco, procuraremos esclarecer quanto dura e como progride o período pré-sintomático em cada uma destas enfermidades. Haverão dois braços do estudo. • O primeiro com pacientes sintomáticos que serão submetidos a avaliação clínica e por RM a cada 12 meses por um período total de 5 anos. • O segundo será formado por indivíduos sob risco para FALS, PEH e SCA. Aqui serão convidados filhos e irmãos assintomáticos de pacientes portadores de formas autossômicas dominantes de FALS, PEH e SCA. Neste braço do estudo, teremos tanto indivíduos portadores da mutação (pré-sintomáticos, que irão desenvolver manifestações da doença futuramente) quanto indivíduos não portadores da mutação (normais, que não irão desenvolver manifestações da doença futuramente). Ambos (pré-sintomáticos e normais) passarão por avaliações clínica e de RM anual ao longo de 5 anos. O acompanhamento dos indivíduos normais será realizado para permitir a comparação do padrão evolutivo com os indivíduos pré-sintomáticos. Estudo clínico : Os pacientes serão submetidos a uma avaliação clínica, com anamnese dirigida e exame neurológico no momento inicial e a cada 12 meses por um período de 5 anos. A idade de início e a duração dos sintomas serão registradas para posterior análise. A quantificação da disfunção clínica será realizada mediante o uso de escalas validadas para o português para cada uma das doenças: 1. FALS: Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale (ALSFERS) (Cedarbaum et al, 1999). 2. PEH: Spastic paraplegia rating scale (SPRS) (Servelhere et al, 2016). 3. SCA: Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) (Braga-Neto

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

et al, 2010). Diagnóstico molecular: Indivíduos sob risco - Os indivíduos sob risco serão submetidos à coleta de amostra de sangue (20ml) através de punção venosa periférica para extração do DNA genômico a partir de linfócitos do sangue periférico. Para cada indivíduo, será feita a pesquisa apenas da mutação já identificada no parente sintomático com o intuito de determinar o estado genético (se portador ou não). O diagnóstico molecular será realizado no laboratório de genética molecular da FCM – UNICAMP, onde o DNA será armazenado. Para cada indivíduo sob risco, será oferecida a possibilidade de ser ou não informado do resultado do seu teste genético (realizado conforme descrito acima). Para aqueles pacientes que manifestem interesse em saber desta informação, será realizado aconselhamento genético conforme diretrizes nacionais e internacionais para testagem preditiva feito por neurogeneticista com experiência, antes e depois da entrega do resultado (Lopes-Cendes et al, 2007) no ambulatório de neurogenética do HC-UNICAMP. O resultado molecular será arquivado pelo pesquisador, de forma a resguardar o participante. Não irá para o prontuário médico do HC-UNICAMP. Se no futuro o houver interesse em saber o resultado poderá entrar em contato com o pesquisador para ser encaminhado à neurogenética. As imagens de RM do crânio e medula cervical serão adquiridas em um sistema de 3T (Achieva-Intera PHILIPS), em planos coronal, axial e sagital volumétrico (3D). Esta última é obtida com cortes de 1mm e permite reconstrução futura de imagens em diferentes planos e inclinações. Os parâmetros de imagem serão estabelecidos conforme protocolo do laboratório de neuroimagem da FCM – UNICAMP; onde ficarão armazenadas.

Critério de Inclusão:

a) Indivíduos sintomáticos (pacientes): Neste grupo, serão incluídos pacientes com manifestações clínicas e confirmação genética molecular de FALS, PEH ou SCA em seguimento regular nos ambulatórios de Neurogenética e Doenças neuromusculares do HC-UNICAMP. Idade superior a 18 anos. Que aceitem a participar do estudo.

-

b) Indivíduos sob risco:

Neste grupo, serão incluídos filhos e irmãos assintomáticos com idade maior de 18 anos de pacientes portadores de formas AD de FALS, PEH ou SCA já com diagnóstico molecular. Aqui teremos, portanto, tanto indivíduos portadores da mutação genética (pré-sintomáticos) quanto indivíduos não portadores da mutação genética (normais). Que aceitem a participar do estudo e realizar o teste molecular.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

Critério de Exclusão:

Critérios de exclusão: Idade inferior a 18 anos, comorbidades neurológicas ou psiquiátricas, contra-indicações para realização do exame de RM (marcapasso cardíaco, claustrofobia).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Objetivo geral- Caracterizar do ponto de vista clínico e de neuroimagem os pacientes com FALS, PEH e SCA assim como os indivíduos sob risco.

Objetivo Secundário:

Objetivos específicos- Determinar a gravidade da disfunção clínica nos pacientes com FALS, PEH e SCA através do uso de escalas padronizadas.- Caracterizar o padrão e gravidade do comprometimento do sistema nervoso central nos pacientes com FALS, PEH e SCA através de estudo de ressonância magnética.
- Caracterizar o padrão evolutivo dos parâmetros clínicos e de neuroimagem nos pacientes com FALS, PEH e SCA.- Caracterizar o padrão e gravidade do comprometimento do sistema nervoso central nos indivíduos pré-sintomáticos com FALS, PEH e SCA- Caracterizar o padrão evolutivo dos parâmetros clínicos e de neuroimagem nos indivíduos pré-sintomáticos com FALS, PEH e SCA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações do pesquisador: "Riscos: O único relacionado ao exame de ressonância magnética é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para me deixar mais confortável. Pessoas claustrofóbicas podem se sentir desconfortáveis durante o exame. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente. Os riscos associados a coleta de material biológico são dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. Se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento. Benefícios: Sua participação no estudo poderá permitir uma avaliação mais detalhada das alterações no cérebro e na medula espinhal de pacientes com essa doença. Os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os pacientes, possibilitando um melhor entendimento da doença e diagnóstico mais precoce. Entretanto não há nenhum benefício ao senhor em participar."

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo informações do pesquisador responsável pelo projeto, presentes no documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1410858_E2.pdf" de 09/08/2019: "Solicitação de emenda para inclusão de dois novos membros da pesquisa, pra realização de avaliação clínica dos pacientes com. Especificamente Fabrício Castro de Borba para avaliação clínica de pacientes com Esclerose lateral amiotrófica e Camila Callegari Pissinin para avaliação clínica dos pacientes com Ataxia de Machado Joseph. Esclarecemos que as avaliações serão as já descritas no projeto, sem alterações."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta emenda, foram analisados os seguintes documentos anexados:

- 1- "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1410858_E2.pdf" de 09/08/2019
- 2- "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1198241_E1.pdf" de 10/08/2018
- 3- "Projeto_MRI_doencas_neurodegenerativas_E2.pdf"
- 4- "Projeto_MRI_doencas_neurodegenerativas.pdf"
- 5- "TCLE_Heredodegenerativas_pacientes.pdf"
- 6- "TCLE_Heredodegenerativas_sob_risco_atualizado.pdf"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda foi submetida devido à inclusão de Fabrício Castro de Borba e Camila Callegari Pissinin à equipe de pesquisa. Não foram realizadas outras alterações, portanto a emenda foi aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1410858_E2.pdf	09/08/2019 11:01:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Heredodegenerativas_sob_risco_atualizado.pdf	09/08/2019 10:54:42	Maria Fernanda Ribeiro Bittar	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_Heredodegenerativas_pacientes.pdf	09/08/2019 10:53:52	Maria Fernanda Ribeiro Bittar	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.544.660

Justificativa de Ausência	TCLE_Heredodegenerativas_pacientes.pdf	09/08/2019 10:53:52	Maria Fernanda Ribeiro Bittar	Aceito
Declaração de Pesquisadores	E2_projeto_imagem.pdf	09/08/2019 10:35:14	Maria Fernanda Ribeiro Bittar	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_MRI_doencas_neurodegenerativas_E2.pdf	09/08/2019 10:29:59	Maria Fernanda Ribeiro Bittar	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/02/2018 16:48:24	Maria Fernanda Ribeiro Bittar	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 30 de Agosto de 2019

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2: Licença para utilização do artigo 1 em teses

15/02/2025, 21:02

RightsLink Printable License

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 15, 2025

This Agreement between Fabrício Castro de Borba ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5970450351231
License date	Feb 15, 2025
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Journal of Neurology
Licensed Content Title	Tract-specific spinal damage in SCA2, SCA3 and SCA6
Licensed Content Author	Fabrício Castro de Borba et al
Licensed Content Date	Dec 12, 2024
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	yes

15/02/2025, 21:02

RightsLink Printable License

Title of new work	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS AO GENE ATXN2: CARACTERIZAÇÃO DO ESPECTRO CLÍNICO E DE NEUROIMAGEM ESTRUTURAL
Institution name	University of Campinas
Expected presentation date	Mar 2025
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Fabício Castro de Borba
Requestor Location	Dr. Fabrício Borba Rua Luís Otavio 2245 Campinas, SP 13087560 Brazil
Customer Tax ID	BR0000
Billing Type	Invoice
Billing Address	University of Campinas Rua Luís Otavio 2245 Campinas, Brazil 13087560
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions

The following terms and conditions ("Terms and Conditions") together with the terms specified in your [RightsLink] constitute the License ("License") between you as Licensee and Springer Nature Customer Service Centre GmbH as Licensor. By clicking 'accept' and completing the transaction for your use of the material ("Licensed Material"), you confirm your acceptance of and obligation to be bound by these Terms and Conditions.

1. Grant and Scope of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, non-sublicensable, revocable, world-wide License to reproduce, distribute, communicate

to the public, make available, broadcast, electronically transmit or create derivative works using the Licensed Material for the purpose(s) specified in your RightsLink Licence Details only. Licenses are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to these Terms and Conditions. You acknowledge and agree that the rights granted to you under this License do not include the right to modify, edit, translate, include in collective works, or create derivative works of the Licensed Material in whole or in part unless expressly stated in your RightsLink Licence Details. You may use the Licensed Material only as permitted under this Agreement and will not reproduce, distribute, display, perform, or otherwise use or exploit any Licensed Material in any way, in whole or in part, except as expressly permitted by this License.

1. 2. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Terms and Conditions, by your RightsLink Licence Details and by any applicable laws.

1. 3. A separate license may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a license has been purchased for print use only, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a License is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the License.

1. 4. Any content within the Licensed Material that is owned by third parties is expressly excluded from the License.

1. 5. Rights for additional reuses such as custom editions, computer/mobile applications, film or TV reuses and/or any other derivative rights requests require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

2. Reservation of Rights

Licensor reserves all rights not expressly granted to you under this License. You acknowledge and agree that nothing in this License limits or restricts Licensor's rights in or use of the Licensed Material in any way. Neither this License, nor any act, omission, or statement by Licensor or you, conveys any ownership right to you in any Licensed Material, or to any element or portion thereof. As between Licensor and you, Licensor owns and retains all right, title, and interest in and to the Licensed Material subject to the license granted in Section 1.1. Your permission to use the Licensed Material is expressly conditioned on you not impairing Licensor's or the applicable copyright owner's rights in the Licensed Material in any way.

3. Restrictions on use

3. 1. Minor editing privileges are allowed for adaptations for stylistic purposes or formatting purposes provided such alterations do not alter the original meaning or intention of the Licensed Material and the new figure(s) are still accurate and representative of the Licensed Material. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, and/or omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author(s) are strictly prohibited.

3. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

3. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP), but any such reuse must include a clear acknowledgment of this permission visible at the same time as the figures/tables/illustration or abstract and which must indicate that the Licensed Material is not part of the governing OA license but has been

reproduced with permission. This may be indicated according to any standard referencing system but must include at a minimum 'Book/Journal title, Author, Journal Name (if applicable), Volume (if applicable), Publisher, Year, reproduced with permission from SNCSC'.

4. STM Permission Guidelines

4. 1. An alternative scope of license may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines ("STM PG") as amended from time to time and made available at <https://www.stm-assoc.org/intellectual-property/permissions/permissions-guidelines/>.
4. 2. For content reuse requests that qualify for permission under the STM PG, and which may be updated from time to time, the STM PG supersedes the terms and conditions contained in this License.
4. 3. If a License has been granted under the STM PG, but the STM PG no longer apply at the time of publication, further permission must be sought from the Rightsholder. Contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

5. Duration of License

5. 1. Unless otherwise indicated on your License, a License is valid from the date of purchase ("License Date") until the end of the relevant period in the below table:

Reuse in a medical communications project	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in a dissertation/thesis	Lifetime of thesis
Reuse in a journal/magazine	Lifetime of journal/magazine
Reuse in a book/textbook	Lifetime of edition
Reuse on a website	1 year unless otherwise specified in the License
Reuse in a presentation/slide kit/poster	Lifetime of presentation/slide kit/poster. Note: publication whether electronic or in print of presentation/slide kit/poster may require further permission.
Reuse in conference proceedings	Lifetime of conference proceedings
Reuse in an annual report	Lifetime of annual report
Reuse in training/CME materials	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in newsmedia	Lifetime of newsmedia
Reuse in coursepack/classroom materials	Reuse up to distribution and/or time period indicated in license

6. Acknowledgement

6. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licensed Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract and must be hyperlinked to the journal/book's homepage.

6. 2. Acknowledgement may be provided according to any standard referencing system and at a minimum should include "Author, Article/Book Title, Journal name/Book imprint, volume, page number, year, Springer Nature".

7. Reuse in a dissertation or thesis

7. 1. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected, the following terms apply: Print rights of the Version of Record are provided for; electronic rights for use only on institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/) and only up to what is required by the awarding institution.

7. 2. For theses published under an ISBN or ISSN, separate permission is required. Please contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

7. 3. Authors must properly cite the published manuscript in their thesis according to current citation standards and include the following acknowledgement: *'Reproduced with permission from Springer Nature'*.

8. License Fee

You must pay the fee set forth in the License Agreement (the "License Fees"). All amounts payable by you under this License are exclusive of any sales, use, withholding, value added or similar taxes, government fees or levies or other assessments. Collection and/or remittance of such taxes to the relevant tax authority shall be the responsibility of the party who has the legal obligation to do so.

9. Warranty

9. 1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. **You are solely responsible for ensuring that the material you wish to license is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity or third party (as credited in the published version).** If the credit line on any part of the Licensed Material indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should seek additional permission from that source to reuse the material.

9. 2. EXCEPT FOR THE EXPRESS WARRANTY STATED HEREIN AND TO THE EXTENT PERMITTED BY APPLICABLE LAW, LICENSOR PROVIDES THE LICENSED MATERIAL "AS IS" AND MAKES NO OTHER REPRESENTATION OR WARRANTY. LICENSOR EXPRESSLY DISCLAIMS ANY LIABILITY FOR ANY CLAIM ARISING FROM OR OUT OF THE CONTENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO ANY ERRORS, INACCURACIES, OMISSIONS, OR DEFECTS CONTAINED THEREIN, AND ANY IMPLIED OR EXPRESS WARRANTY AS TO MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, OR EXEMPLARY DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE LICENSED MATERIAL REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION

15/02/2025, 21:02

RightsLink Printable License

APPLIES NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE
OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

10. Termination and Cancellation

10. 1. The License and all rights granted hereunder will continue until the end of the applicable period shown in Clause 5.1 above. Thereafter, this license will be terminated and all rights granted hereunder will cease.

10. 2. Licensor reserves the right to terminate the License in the event that payment is not received in full or if you breach the terms of this License.

11. General

11. 1. The License and the rights and obligations of the parties hereto shall be construed, interpreted and determined in accordance with the laws of the Federal Republic of Germany without reference to the stipulations of the CISG (United Nations Convention on Contracts for the International Sale of Goods) or to Germany's choice-of-law principle.

11. 2. The parties acknowledge and agree that any controversies and disputes arising out of this License shall be decided exclusively by the courts of or having jurisdiction for Heidelberg, Germany, as far as legally permissible.

11. 3. This License is solely for Licensor's and Licensee's benefit. It is not for the benefit of any other person or entity.

Questions? For questions on Copyright Clearance Center accounts or website issues please contact springernaturesupport@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777. For questions on Springer Nature licensing please visit <https://www.springernature.com/gp/partners/rights-permissions-third-party-distribution>

Other Conditions:

Version 1.4 - Dec 2022

Questions? customercare@copyright.com.

Anexo 3: Licença para utilização do artigo 2 em teses

26/04/2025, 16:15

marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb...


Marketplace

This is a License Agreement between de Borba, Fabrício Castro ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	23-Apr-2025	Type of Use	Republish in a
Order License ID	1602786-1	Publisher	thesis/dissertation
ISSN	1432-1459	Portion	DR DIETRICH STEINKOPFF VERLAG Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of neurology	Rightsholder	Springer Nature BV
Article Title	Distinct patterns of cerebral and spinal pathology along the spectrum of ATXN2 - related disorders	Publication Type	e-Journal
		Start Page	330
		Issue	5
		Volume	272
Author / Editor	European Neurological Society., Deutsche Gesellschaft für Neurologie.	URL	http://link.springer-ny.com/link/service/journals/00415/index.htm
Date	01/01/1974		
Language	English, English		
Country	Germany		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-14	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	14	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD

NEW WORK DETAILS

Title	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS AO GENE ATXN2: CARACTERIZAÇÃO DO ESPECTRO CLÍNICO E DE NEUROIMAGEM ESTRUTURAL	Institution Name	University of Campinas
		Expected Presentation Date	2025-07-01
Instructor Name	Marcondes Cavalcante França Jr		

<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb322fd8>

1/7

26/04/2025, 16:15 marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb...

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person / Organization to Appear on the License de Borba, Fabrício Castro

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Distinct patterns of cerebral and spinal pathology along the spectrum of ATXN2-related disorders	Title of the Article / Chapter the Portion Is From	Distinct patterns of cerebral and spinal pathology along the spectrum of ATXN2-related disorders
Editor of Portion(s)	N/A	Author of Portion(s)	N/A
Volume / Edition	272	Publication Date of Portion	2025-05-01
Page or Page Range of Portion	330		

Marketplace Permissions General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

1) **Definitions.** For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

"Order Confirmation" is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Confirmation Terms" are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

"User" or "you" is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User's behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

"Work(s)" are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) **Description of Service.** CCC's Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant Order Confirmation.

3) **Applicability of Terms.** The Terms govern User's use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) **Representations; Acceptance.** By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) **Scope of License; Limitations and Obligations.** All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) General Payment Terms. User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) General Limits on Use. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is unlawful, including without limitation if such use would violate applicable sanctions laws or regulations, would be defamatory, violate the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. Any unlawful use will render any licenses hereunder null and void. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) Third Party Materials. In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) Copyright Notice. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach

26/04/2025, 16:15 marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb...

not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) Additional Terms for Specific Products and Services. If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) *Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts).* For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) **Books and Records; Right to Audit.** As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) *Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets).* For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb322fd8>

4/7

26/04/2025, 16:15

marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb...

A) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content**, which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) **Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content**, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such "clipping" or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,
- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also

26/04/2025, 16:15

marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb...

ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) **Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery).** The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;

ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;

iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;

iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;

v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) **Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet).** For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republishing date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.

ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or "clipping" does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) Miscellaneous.

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the

26/04/2025, 16:15 marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/a7110fe7-4f0d-4420-9e76-0a9ce24ff970/2b35eb40-40e5-4a8f-8b9c-94a8eb...

prior terms and conditions in the order workflow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

Last updated October 2022