

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ANÁLISE DE REPETIÇÕES CAG NOS GENES SCA1, SCA2, SCA3 E SCA6 EM
PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE ATAXIA ESPINOCEREBELAR**

Vanessa Erichsen Emmel

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Porto Alegre, março de 2007

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica e no Laboratório de Identificação Genética do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX e FIPE-HCPA.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira, pela orientação, entusiasmo e pelo aprendizado proporcionado a mim, indispensáveis ao meu crescimento profissional e científico.

Aos professores Lavínia Schüler-Faccini, Giancarlo Pasquali e Carlos Alexandre Netto, por aceitarem o convite para participar da banca.

À equipe do Ambulatório de Neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Dra. Laura Bannach Jardim, pelo trabalho clínico junto aos pacientes.

Aos pacientes e seus familiares por proverem amostras biológicas para este estudo.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular, pela amizade, alegria, motivação e pelos momentos de descontração.

Às colegas de aula, pela convivência agradável e divertida.

Ao Elmo e à Ellen, secretários do PPGBM, sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

Aos meus amigos, pela amizade incondicional e verdadeira.

À minha família, pelo carinho, interesse, apoio e estímulo.

Ao meu namorado Maurício, pela compreensão, amor e por estar sempre ao meu lado me dando forças para que eu pudesse transpor todas as barreiras e concluir mais esta etapa.

Ao CNPq e FIPE-HCPA pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Mutações dinâmicas e doenças humanas.....	11
1.2. Doenças de repetições nucleotídicas	13
1.3. Ataxias espinocerebelares	14
1.3.1. Manifestações clínicas	16
1.3.2. Caracterização molecular	16
1.3.3. Patogênese.....	20
1.3.4. Antecipação.....	25
1.3.5. Prevalência mundial.....	26
1.3.6. Alelos normais grandes.....	29
1.3.7. Diagnóstico.....	31
1.3.8. Estratégias terapêuticas.....	34
1.4. Justificativa	37
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivos Gerais.....	39
2.2. Objetivos Específicos	39
3. ARTIGO	40
4. DISCUSSÃO	65
4.1. Validação da metodologia de PCR multiplex e eletroforese capilar para análise quantitativa de repetições CAG nos <i>loci</i> SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6	65
4.2. Distribuição dos alelos normais na população analisada.....	67
4.3. Frequências dos alelos normais grandes <i>versus</i> frequências relativas das SCAs	69
4.4. Transferência da tecnologia PCR multiplex-EC para a rotina laboratorial	72
4.5. Considerações finais.....	72
5. REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Frequências das SCAs em famílias brasileiras	29
Figura 2. Algoritmo utilizado para um diagnóstico diferencial de SCAs	32
Figura 3. Detecção molecular da doença de Machado-Joseph (ou SCA3)	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Tipos de repetições trinucleotídicas associadas com doenças hereditárias	14
Tabela 2. Classificação das ADCAs modificado de Harding	15
Tabela 3. Principais manifestações clínicas da SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6	17
Tabela 4. Bases moleculares das ataxias cerebelares autossômicas dominantes	19
Tabela 5. Aspectos moleculares das SCAs estudadas neste trabalho	20
Tabela 6. Frequências das SCAs e DRPLA em várias populações	28

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

A	adenina
ADCA	ataxia cerebelar autossômica dominante (<i>Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia</i>)
AEs	alelos expandidos
AIs	alelos intermediários
ANGs	alelos normais grandes
C	citosina
DH	doença de Huntington
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DRPLA	atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (<i>Dentatorubral Pallido Luysian Atrophy</i>)
EC	eletroforese capilar
G	guanina
HATs	histonas acetiltransferases
HDACs	histonas desacetilases
HDCAis	inibidores de histonas desacetilases
MJD	doença de Machado-Joseph (<i>Machado-Joseph Disease</i>)
NII	inclusões intranucleares neuronais (<i>Neuronal Intranuclear Inclusions</i>)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pmol	picomol
p/v	peso por volume

RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
SCA	ataxia espinocerebelar (<i>Spinocerebellar Ataxia</i>)
SPU	sistema proteossomo dependente de ubiquitina
T	timina
v/v	volume por volume

RESUMO

As ataxias espinocerebelares (SCAs) são doenças neurodegenerativas com herança autossômica dominante que apresentam grande heterogeneidade clínica e genética. O diagnóstico é realizado pela detecção da mutação no gene causador, que, na sua maioria, é uma expansão de repetições trinucleotídicas CAG. O objetivo deste estudo foi analisar os polimorfismos de repetições trinucleotídicas nos genes associados as SCAs tipo 1, tipo 2, tipo 3 e tipo 6 através de PCR-multiplex e eletroforese capilar, visando a melhoria do diagnóstico molecular e a determinação da distribuição das regiões polimórficas nos alelos normais. As análises foram realizadas em 124 pacientes não-aparentados que apresentavam sintomas de ataxia. Nessa amostra, foram identificados 10 pacientes com SCA2, 39 pacientes com SCA3 e 2 pacientes com SCA6. Não encontramos amostras com uma expansão CAG no gene SCA1. Os polimorfismos de cada *loci* foram estudados nos cromossomos normais desses pacientes (n=209-248). A frequência dos alelos normais grandes no *locus* SCA1 (>32 repetições CAG) foi estabelecida em 0,05 e no *locus* SCA2 (>22 repetições CAG) foi 0,11, enquanto que no *locus* SCA3 (alelos >28 repetições) a frequência foi 0,11. A frequência de alelos normais grandes para o *locus* SCA6 (>13 repetições) foi 0,04. Concluindo, este estudo proporcionou a primeira análise detalhada da distribuição de repetições CAG nos *loci* SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6 por amplificação multiplex e eletroforese capilar em pacientes brasileiros. A frequência dos alelos normais grandes nos genes SCA3 e SCA6 nessa amostra reflete a prevalência destas duas doenças na nossa população, concordando com a hipótese que alelos patogênicos podem ser originados pela expansão de alelos normais grandes.

ABSTRACT

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are neurodegenerative disorders inherited as an autosomal dominant trait that present large genetic and clinical heterogeneity. An accurate diagnosis relies on mutation detection in a specific causative gene, which is typically an abnormal number of CAG trinucleotide repeats. The aim of this study was to analyze polymorphic regions of trinucleotide repeats in SCA1, SCA2, SCA3, and SCA6 associated genes through multiplex PCR and capillary electrophoresis, aiming the improvement of molecular diagnosis and distribution of CAG repeats number in normal alleles. Analyses were carried out in 124 unrelated Brazilian patients who presented symptoms of progressive ataxia. To date, we identified 10 patients with SCA2, 39 patients with SCA3, and 2 patients with SCA6. No alleles were identified with a CAG expansion tract in the SCA1 gene. Normal CAG repeats length range was established using data from normal chromosomes (n=209-248). Frequency of large normal alleles in SCA1 locus (>32 CAG repeats) was determined to be 0.05. Frequency of large normal alleles at the SCA2 locus (>22 CAG repeats) was shown to be 0.11 while at the SCA3 locus (>28 CAG repeats) frequency of large normal alleles was 0.11. At the SCA6 locus, frequency of large normal alleles (>13 CAG repeats) was found to be 0.04. Moreover, this study provides the first detailed analysis, to our knowledge, of the distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2, SCA3, and SCA6 loci by multiplex-PCR and automated capillary electrophoresis in Brazilian patients. Frequency of large normal alleles in SCA3 and SCA6 genes established in this sample reflects the prevalence of these two diseases in our population, supporting the hypothesis that disease alleles emerge from expansion of large normal alleles.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mutações dinâmicas e doenças humanas

Até o início da década de 90, os genes eram considerados entidades biológicas herdadas como seqüências estáveis. As modificações nestas seqüências seriam raras e independentes, causadas por polimorfismos neutros ou por mutações causadoras de doenças que eram estáveis na transmissão para as próximas gerações (Gusella & MacDonald, 1996). Em 1991, um novo evento mutacional completamente novo foi descrito em pacientes com a Síndrome do X-frágil (Oberle *et al*, 1991; Verkerk *et al*, 1991; Kremer *et al*, 1991). Este evento, uma expansão instável de trinucleotídeos ordenada seqüencialmente no DNA, ocorre como um polimorfismo natural em indivíduos sem a doença. Este mecanismo de expansão de seqüências repetidas de DNA é agora conhecido como a causa primária de diversas doenças neurológicas humanas (Richards, 2001).

O mecanismo proposto para as mutações dinâmicas envolve a expansão de uma seqüência nucleotídica que alcança um tamanho patológico específico para cada doença. Isto explica o padrão incomum de herança exibido para algumas dessas doenças. A repetição mutante é instável nas células somáticas e germinativas e as expansões ocorrem mais freqüentemente que as retrações (Warren, 1996; Timchenko & Caskey, 1996; Cummings & Zoghbi, 2000). Os caminhos que levam à expansão estão sendo extensivamente estudados mas ainda não são bem entendidos. Contudo, dados moleculares sobre as doenças causadas por expansões sugerem mecanismos comuns para a gênese das repetições expandidas, bem como a identificação de elementos *cis* e *trans*-atuantes que estariam associados à instabilidade genética, incluindo seqüências próximas que poderiam influenciar a formação de expansões (Richards, 2001; Brock *et al*, 1999).

Alguns autores sugerem que a participação de estruturas alternativas de DNA durante a replicação, reparo e recombinação poderiam estar envolvidas no processo (Pearson & Sinden, 1998; Jakupciak & Wells, 2000). Uma explicação mais simples seria que a própria natureza repetitiva da seqüência levaria a um 'deslize' durante a replicação

do DNA que, se não fosse reparado, poderia tornar-se uma repetição expandida após um segundo ciclo de replicação (Kunkel, 1993; Strand *et al*, 1993).

Modelagem *in vitro* e sistemas heterólogos indicam que a ocorrência de estruturas secundárias no segmento de DNA contendo as repetições poderia levar a expansões e/ou retrações durante a replicação e que a instabilidade poderia ser influenciada pela orientação do segmento contendo as repetições, incluindo sua relação com a forquilha de replicação e o fragmento de Okazaki (Maurer *et al*, 1996; Kang *et al*, 1996; Mirkin, 2006). A modificação nas propriedades de proteínas envolvidas na replicação e no reparo do DNA sugere um efeito potencial na estrutura da cromatina que também poderia afetar o equilíbrio entre expansão e retração (Owen *et al*, 2005). Outra possível explicação sugere o envolvimento de recombinação na instabilidade do DNA (Usdin & Grabczyk, 2000).

Estruturas secundárias de repetições expandidas também podem contribuir para a sua instabilidade em células que não se dividem. Expansões de repetições são evidentes em tecidos pós-mitóticos de pacientes, tais como cérebro e músculo esquelético (Thornton *et al*, 1994; Kennedy *et al*, 2003). Este fato é explicado como uma consequência da falha de reparo das repetições (Kovtun & McMurray, 2001). Radicais de oxigênio ou outros agentes ambientais podem produzir quebras ou pequenas falhas na faixa repetitiva. No processo de síntese para reparar o DNA, a fita é deslocada formando uma alça que, contendo as repetições, se tornará estável e não será clivada pela endonuclease (Panigrahi *et al*, 2005).

Uma repetição inicia a expandir-se quando seu comprimento excede um limiar específico para cada gene. Alelos normais geralmente têm seqüências repetitivas muito mais curtas. Os então chamados ‘alelos normais grandes’ apresentam grande número de repetições, com interrupções de outros nucleotídeos que estabilizam a seqüência. Nos alelos expandidos, as interrupções geralmente estão ausentes, criando expansões repetitivas homogêneas instáveis (Kunst & Warren, 1994). Portanto, existe uma relação entre integridade da repetição e sua propensão a expandir. Embora expansões ocorram com uma freqüência de mutação próxima ao tamanho limiar, grandes repetições expandem com quase 100% de probabilidade (Mirkin, 2006).

Uma característica das doenças causadas por expansões no DNA é ocorrência de viés de transmissão. Para a maioria destas doenças há um maior risco de expansão pela transmissão paterna, enquanto em outras, como síndrome do X-frágil, ataxia de Friedreich

e formas congênitas de distrofia miotônica, os alelos transmitidos pela mãe estão mais propensos a causar fenótipos mais severos (Cummings & Zoghbi, 2000). Herança paterna está geralmente associada a pequenas expansões, enquanto que grandes expansões apresentam transmissão materna (Usdin & Grabczyk, 2000). Um modelo de pressão seletiva diferencial nas células gaméticas é proposto para explicar este viés (Paulson & Fischbeck, 1996).

De acordo com a localização da seqüência instável no gene, as doenças poderiam ser divididas em doenças codificantes e não-codificantes (Cummings & Zoghbi, 2000; Paulson & Fischbeck, 1996). O grupo codificante compreende doenças neurodegenerativas progressivas nas quais a patogênese é geralmente confinada ao sistema nervoso e a repetição expandida é traduzida em uma faixa anormal de poliglutamina na proteína. O grupo não-codificante compreende doenças multissistêmicas não-progressivas, nas quais as expansões estão fora da região codificante do respectivo gene, resultando na alteração do padrão de expressão gênica. As expansões no primeiro grupo são geralmente pequenas, possuindo não mais que 100 repetições, apresentando um grande contraste com massivas expansões de mais de 1000 repetições observadas no segundo grupo (Cummings & Zoghbi, 2000; Costa Lima & Pimentel, 2004).

Modelos moleculares de expansão de repetições podem satisfatoriamente explicar a maioria dos dados experimentais. Mas nenhum deles foi provado definitivamente. Assim, futuros estudos genéticos e bioquímicos são necessários. Os eventos que levam a conversão de repetições normais grandes à expansão, os quais são atualmente pouco compreendidos, são de particular interesse (Mirkin, 2006).

1.2. Doenças de repetições nucleotídicas

Várias doenças neurodegenerativas apresentam como causa primária uma mutação dinâmica, onde repetições nucleotídicas estão presentes diversas vezes no DNA. Estas repetições são polimórficas, significando que o número de repetições em um *locus* é variável na população. As repetições se diferenciam em “normais” e “expandidas patologicamente”. Repetições normais são estáveis; isto é, o tamanho da repetição se mantém inalterado de geração para geração. Repetições patológicas são instáveis e tendem

a se expandir durante a transmissão vertical. Até o momento, quatro tipos de expansões de repetições trinucleotídicas instáveis foram identificadas (Tabela 1) (Schelhaas *et al*, 2000).

Tabela 1. Tipos de repetições trinucleotídicas associadas com doenças hereditárias

Expansão trinucleotídica	Doença	Herança
CCG	Síndrome do X-frágil	Ligada ao X
CTG	Distrofia miotônica	Autossômica dominante
	SCA8	Autossômica dominante
GAA	Ataxia de Friedreich	Autossômica recessiva
CAG	Doença de Huntington	Autossômica dominante
	Atrofia muscular espinobulbar	Ligada ao X
	SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12 e SCA17	Autossômica dominante
	DRPLA	Autossômica dominante

SCA: ataxia espinocerebelar (*Spinocerebellar Ataxia*)

DRPLA: atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (*Dentatorubral Pallidoluysian Atrophy*)

1.3. Ataxias espinocerebelares

As ataxias hereditárias podem ser divididas pelo modo de herança (autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X e mitocondrial) e pelo gene causador ou *locus* cromossômico (Bird, 2006).

Até a década de 90, ataxias espinocerebelares eram particularmente controversas em termos de nomenclatura e classificação. Inicialmente, Harding (1983) propôs uma classificação das ataxias cerebelares autossômicas dominantes (*Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia - ADCA*) com base nos sintomas clínicos e diferenciação destas doenças em três grupos principais (Tabela 2). De acordo com as manifestações clínicas, as ADCA foram classificadas em três grupos distintos, chamados de ADCA tipos I a III. ADCA I é o grupo mais heterogêneo, no qual os sintomas incluem progressiva ataxia cerebelar,

oftalmoplegia supranuclear, sinais piramidais e extrapiramidais, demência moderada, atrofia ótica e neuropatia periférica. O grupo ADCA II é o mais homogêneo e inclui, além dos sintomas citados para ADCA I, degeneração macular e retinal. O grupo ADCA III compreende somente ataxias cerebelares de início tardio (Harding, 1993). Contudo, existe uma significativa sobreposição fenotípica entre diferentes formas de ADCA bem como significativa variabilidade fenotípica em cada subtipo (Schelhaas *et al*, 2000).

Tabela 2. Classificação das ADCAs modificada de Harding¹

Tipo de ADCA	ADCA I	ADCA II	ADCA III
Apresentação clínica	Síndrome cerebelar com oftalmoplegia, sinais piramidais e extrapiramidais, prejuízo cognitivo, neuropatia periférica	Síndrome cerebelar com retinopatia pigmentar	Síndrome cerebelar “pura”
Neuropatologia	Degeneração do cerebelo e do gânglio basal, córtex cerebral, nervo ótico, trato espinhal, nervos periféricos	Degeneração do cerebelo e da retina	Degeneração cerebelar
<i>Locus</i> gênico ²	SCA1, SCA2, SCA3, SCA4, SCA8, SCA10, SCA12, SCA13, SCA17, SCA18, SCA19/22, SCA20, SCA21, SCA23, SCA24, SCA25, SCA27, SCA28, DRPLA	SCA7	SCA5, SCA6, SCA11, SCA14, SCA15, SCA16, SCA26

¹ Harding AE, 1983.

² Alguns *loci* podem apresentar sobreposição de características clínicas com outro tipo de ADCA.

Com a descoberta das bases moleculares, as ADCAs vêm sendo amplamente caracterizadas em termos de sua mutação genética e denominadas como ataxias espinocerebelares (*Spinocerebellar Ataxia – SCA*). As SCAs formam um grupo heterogêneo de doenças neurodegenerativas hereditárias caracterizadas por uma lenta e progressiva disfunção cerebelar. Como a classificação das ADCAs é puramente clínica, ela só pode ser aplicada individualmente. Por exemplo, em uma família com SCA6, poderia ter alguns membros com ADCA I e outros com ADCA III (Schelhaas *et al*, 2000).

1.3.1. Manifestações clínicas

Ataxia, do grego *ataxis*, é um termo que literalmente significa desordem ou confusão. O termo ataxia locomotora vem sendo empregado desde o século XIX, significando perda total ou parcial dos movimentos coordenados, sendo um sintoma comum em diversas doenças neurológicas. Ataxia pode ser causada pela disfunção nas vias aferentes e eferentes do cerebelo (Harding, 1993; Klockgether *et al*, 2000). Um bom exemplo de um indivíduo atáxico é a pessoa em estado de embriaguez: a fala é mal articulada, explosiva, intercutada (disartria), o andar de base alargada, em equilíbrio instável, os movimentos finos das mãos são desajeitados, por vezes com tremor. Quando muito marcada, a ataxia pode afetar o equilíbrio do tronco, com oscilações e desequilíbrio na posição sentada.

Os indivíduos afetados apresentam dificuldade de coordenação dos movimentos do corpo, problemas oculares, sinais piramidais, certas manifestações extrapiramidais (Parkinsonismo), além de outros achados associados (Bird, 2006; Klockgether *et al*, 2000). A Tabela 3 apresenta um resumo das manifestações clínicas para SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 e SCA7.

1.3.2. Caracterização molecular

A heterogeneidade clínica inter e intra-familiar dificultou a diferenciação desse grupo de doenças até a década de 90, durante a qual a descoberta das bases moleculares das SCAs proporcionou a classificação e o diagnóstico preciso das mesmas. Exemplo bem claro dessa situação é a enfermidade que acometeu membros da família Drew, originária de Walworth, uma localidade existente na região nordeste da Inglaterra. A partir do ano de 1895, seus dados clínicos foram avaliados por vários neurologistas de renome com diferentes hipóteses diagnósticas, tais como paralisia agitante, esclerose múltipla e sífilis. O diagnóstico definitivo só foi realizado 100 anos após, em 1995, através dos estudos de genética molecular, detectando a presença da SCA3 (Teive & Arruda, 2004).

Tabela 3. Principais manifestações clínicas da SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6

Doença	Manifestações clínicas	Referência
SCA1	Total ataxia de marcha e de membros, disartria e disfunção bulbar. Com a progressão, alguns pacientes desenvolvem sacada anormal, nistagmo, oftalmoparesia, atrofia ótica, hipertonia (usualmente precoce), hipotonia (tardia), e diminuição dos reflexos dos tendões. Estágio final inclui fraqueza facial, dificuldades com deglutição ou respiração e sinais extrapiramidais incluindo distonia e coréia ¹ .	Subramony & Vig, 1998
SCA2	Ataxia de marcha e de membros, disartria e movimentos anormais dos olhos. Neuropatia, coréia ou distonia e demência estão frequentemente presentes, e sinais piramidais estão ocasionalmente presentes.	Geschwind <i>et al</i> , 1997; Cancel <i>et al</i> , 1997
SCA3	Ampla espectro, arbitrariamente dividida em quatro tipos: Tipo 1, com longas repetições, início na juventude, distonia e rigidez; Tipo 2 (a forma mais comum), com idade de início entre 20 e 45 anos, e sinais cerebelares e piramidais; Tipo 3, com idade de início entre 40 e sessenta anos, progressão lenta, predominância de sinais cerebelares e neuropatia periférica; e possivelmente o Tipo 4, com proeminente Parkinsonismo.	Paulson, 1998
SCA6	Manifestações cerebelares predominam, particularmente nos primeiros dez anos, embora sinais não-cerebelares como oftalmoplegia, espasticidade, neuropatia periférica, disfagia e Parkinsonismo algumas vezes se manifestam no curso da doença. O curso é lentamente progressivo e cadeira de rodas pode não ser necessária por 15 anos.	Zhuchenko <i>et al</i> , 1997; Schols <i>et al</i> , 1998; Ikeuchi <i>et al</i> , 1997.

Até o momento, 28 *loci* distintos foram associados às formas mendelianas de SCAs (Tabela 4). Sete delas, a SCA1, a SCA2, a SCA3, a SCA6, a SCA7, a SCA17, e a DRPLA apresentam como alteração uma expansão de repetições trinucleotídicas CAGs na região codificante dos genes, as quais codificam o aminoácido glutamina (Bird, 2006).

¹ O termo "coréia", derivado do grego, significa dança e é uma designação muito apropriada para as alterações motoras semelhantes a alguns passos de dança.

Expansão de repetições nucleotídicas também pode ocorrer em três outros locais dos genes associados às SCAs: na região promotora na SCA12 (CAG), em um intron na SCA10 (ATTCT) e na região 3' não traduzida do RNA transcrito na SCA8 (CTG) (Koob *et al*, 1999; Ranum *et al*, 2002).

Em todas as SCAs, exceto na SCA8, expansões de repetições CAG são mais prováveis de ocorrer pela transmissão paterna do alelo expandido (Bird, 2006). No entanto, na SCA8, a maioria das expansões da repetição CTG ocorre durante transmissão materna (Koob *et al*, 1999). Repetições extremamente longas (~800 CTG) na SCA8 podem estar associadas com ausência de sintomas clínicos (Ranum *et al*, 2002). Atualmente, análise de repetições CTG em SCA8 possuem mais valor científico do que diagnóstico e testes pré-sintomáticos parecem não serem apropriados (Schöls *et al*, 2003).

Alguns aspectos moleculares das SCAs estudadas neste trabalho encontram-se na Tabela 5.

Na SCA1, há uma sobreposição entre os alelos normais e patológicos. Nesta faixa, repetições CAG normais são interrompidas por códons CAT, enquanto que expansões patológicas são puras, com repetições CAG não-interrompidas. Na SCA2, o alelo com 32 repetições é considerado de significância indeterminada. Assim como para SCA1, existindo interrupções – neste caso pelo códon CAA – o alelo pode ser considerado normal, enquanto que na ausência de interrupções é considerado patológico (Pulst *et al*, 1996; Subramony & Filla, 2001).

Pacientes homozigotos para algumas SCAs já foram identificados. Trabalhos publicados descreveram que homozigotos para SCA3 têm início mais precoce dos sintomas (7-37 anos) e uma síndrome neurológica mais grave do que heterozigotos (Coutinho *et al*, 1982; Lang *et al*, 1994; Lerer *et al*, 1996; Sobue *et al*, 1996; Fukutake *et al*, 2002b). Uma família indiana com indivíduos homozigotos para SCA2 apresentando um fenótipo complexo também já foi descrita (Ragothaman *et al*, 2004).

Tabela 4. Bases moleculares das ataxias cerebelares autossômicas dominantes

Subtipo de SCA	Gene	Locus	Proteína	Referência
SCA1	<i>ATXN1</i>	6p23	Ataxina 1	Orr <i>et al</i> , 1993
SCA2	<i>ATXN2</i>	12q24.13	Ataxina 2	Imbert <i>et al</i> , 1996 Pulst <i>et al</i> , 1996 Sanpei <i>et al</i> , 1996
SCA3	<i>ATXN3</i>	14q24.3-q31	Ataxina 3	Kawaguchi <i>et al</i> , 1994
SCA4	<i>SCA4</i>	16q24-qter	Desconhecida	Flanigan <i>et al</i> , 1996
SCA5	<i>SPTBN2</i>	11q13.2	Beta espectrina III	Ikeda <i>et al</i> , 2006
SCA6	<i>CACNA1A</i>	19p13.13	CACNA1A	Zhuchenko <i>et al</i> , 1997
SCA7	<i>ATXN7</i>	3p21.1-p12	Ataxina 7	David <i>et al</i> , 1997
SCA8	<i>KLHL1AS</i>	13q21	Desconhecida	Koob <i>et al</i> , 1999
SCA9 ¹	Desconhecido	Reservado	Desconhecida	---
SCA10	<i>ATXN10</i>	22q13.31	Ataxina 10	Matsuura <i>et al</i> , 2000
SCA11	<i>SCA11</i>	15q14-q21.3	Desconhecida	Worth <i>et al</i> , 1999
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	5q31-q33	PPP2R2B	Holmes <i>et al</i> , 1999
SCA13	<i>KCNC3</i>	19q13.3-q13.4	KCNC3	Waters <i>et al</i> , 2006
SCA14	<i>PRKCG</i>	19q13.42	PRKCG	Chen <i>et al</i> , 2003
SCA15	Desconhecido	3p26.1-p25.3	Desconhecida	Gardner <i>et al</i> , 2005
SCA16	<i>SCA16</i>	3p26.2-pter	Contactina 4	Miura <i>et al</i> , 2006
SCA17	<i>TBP</i>	6q27	TBP	Nakamura <i>et al</i> , 2001
SCA18	<i>SCA18</i>	7q22-q32	Desconhecida	Devos <i>et al</i> , 2001
SCA19 ²	<i>SCA19</i>	1p21-q21	Desconhecida	Verbeek <i>et al</i> , 2002
SCA20	<i>SCA20</i>	11cen	Desconhecida	Knight <i>et al</i> , 2004
SCA21	<i>SCA21</i>	7p21-15	Desconhecida	Vuillaume <i>et al</i> , 2002
SCA22 ²	Desconhecido	1p21-q23	Desconhecida	Chung <i>et al</i> , 2003
SCA23	Desconhecido	20p13-12.3	Desconhecida	Verbeek <i>et al</i> , 2004
SCA24	Desconhecido	1p36	Desconhecida	Swartz <i>et al</i> , 2002
SCA25	<i>SCA25</i>	2p21-p13	Desconhecida	Stevanin <i>et al</i> , 2005
SCA26	Desconhecido	19p13.3	Desconhecida	Yu <i>et al</i> , 2005
SCA27	<i>FGF14</i>	13q34	FGF14	van Swieten <i>et al</i> , 2003
SCA28	Desconhecido	18p11.22-q11.2	Desconhecida	Cagnoli <i>et al</i> , 2005
DRPLA	<i>ATNI</i>	12p13.31	Atrofina 1	Koide <i>et al</i> , 1994
Indefinido ³	<i>PLEKHG4</i>	16q22.1	Puratrofina 1	Ishikawa <i>et al</i> , 2005

¹A categoria SCA9 foi reservada, mas informações clínicas e genéticas deste tipo ainda não foram publicadas. ²SCA19 e SCA22 são prováveis formas alélicas do mesmo gene. ³Famílias japonesas com uma única substituição C>T na região 16q22 do gene *PLEKHG4* (Ishikawa *et al*, 2005; Ohata *et al*, 2006).

Tabela 5. Aspectos moleculares das SCAs estudadas neste trabalho

Tipo	OMIM¹	Localização	Alelo normal (CAG)n	Alelo expandido (CAG)n
SCA1	164400	Exon	6-44	39-83
SCA2	183090	Exon	14-31	33-64; >200 ²
SCA3	109150	Exon	12-44	55-88
SCA6	183086	Exon	4-18	21-33

¹Número de acesso no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>. ²Centenas de repetições CAG em casos raros de início neonatal/juvenil de SCA2 (Babovic-Vuksanovic *et al*, 1998).

Mariotti e colaboradores (2001) descreveram um caso de um paciente com SCA6 homozigoto para um alelo intermediário de 19 repetições CAG. Um efeito patogênico dose-dependente foi demonstrado pelo fenótipo típico de SCA6 comparado a indivíduos heterozigotos para o mesmo alelo que foram assintomáticos por mais de 90 anos de idade. Efeito de dependência de dose foi descrito em alguns estudos (Geschwind *et al*, 1997a; Matsumura *et al*, 1997; Ikeuchi *et al*, 1997), embora outros não tenham encontrado diferenças aparentes no fenótipo clínico entre homozigotos e heterozigotos (Ishikawa *et al*, 1997; Matsuyama *et al*, 1997; Takiyama *et al*, 1998). Os números de repetições CAG já descritos para indivíduos homozigotos SCA6 foram 19/19, 21/21, 22/22, 23/23 e 25/25. Alelos com um número de repetições maior que 25 não foram encontrados, talvez devido a impossibilidade de nascimento ou da sobrevivência de adultos com este genótipo (Fukutake *et al*, 2002).

1.3.3. Patogênese

Estudos prévios sugerem que o tamanho da expansão trinucleotídica se correlaciona com a idade de início da doença, nível de progressão ou, ainda, com sua gravidade clínica (Sasaki, 1999). Uma correlação inversa entre a idade de início e o tamanho da seqüência que contém as repetições é observada e, embora o indivíduo já nasce com o alelo mutante, as conseqüências neurológicas somente aparecerão após algumas décadas de vida, durante o qual as funções neuronais são normais (Zoghbi, 2000).

SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 e DRPLA podem ter um mecanismo patogênico similar, já que suas repetições CAG expandidas codificam poliglutaminas e o limiar patogênico é aproximadamente o mesmo, em torno de 40 cópias da repetição na maioria dos subtipos (Dueñas *et al*, 2006). A expansão das repetições CAG não altera a transcrição ou a tradução dos genes alvo, mas leva à ocorrência de extensões anormais de poliglutamina na proteína, que são geralmente acumuladas no núcleo celular na forma de agregados insolúveis e estruturas neuropatológicas chamadas inclusões intranucleares neuronais (*Neuronal Intranuclear Inclusions - NII*) (Clark & Orr, 2000; Orr & Zoghbi, 2000; Davies *et al*, 1998). Estas inclusões apresentam componentes celulares como ubiquitina, componentes do proteossomo, chaperonas e fatores de transcrição (Cummings *et al*, 1998; McCampbell *et al*, 2000; Schmidt *et al*, 2002). Ainda não se sabe se a toxicidade é um resultado direto dos agregados ou resultante de estruturas intermediárias formadas durante o processo de agregação. O bloqueio da agregação tem sido um método utilizado para minimizar a toxicidade. A propriedade de agregação e as possíveis interações causadas pelos agregados nos núcleos das células parecem ser a maior causa de morte celular (Siyanova & Mirkin, 2001; Perutz & Windle, 2001).

Na SCA6, a degeneração de células de Purkinje está associada com expansões de poliglutamina no gene *CACNA1A* (Zhuchenko *et al*, 1997). O gene *CACNA1A* codifica a subunidade alfa 1A, que é a maior subunidade formadora de poros do canal de cálcio voltagem dependente tipo P/Q (Pietrobon, 2002). A cadeia de poliglutamina está localizada na extremidade carboxílica dessa subunidade (Kardasch & Martinez, 2004). Este canal também é formado por subunidades acessórias beta e gama. Subunidades alfa são glicoproteínas de membrana de aproximadamente 2400 aminoácidos. Canais de cálcio tipo P/Q são ativados por alta voltagem, encontrados principalmente nos neurônios e expressos em células de Purkinje no córtex cerebelar. Acredita-se que seu principal papel é na transmissão sináptica (Mantuano *et al*, 2003). O mecanismo de degeneração na SCA6 é provavelmente causado pela perda da função do canal, resultando em um influxo celular de cálcio. O aumento de cálcio intracelular resulta na morte da célula por uma cascata de eventos deletérios (Zoghbi, 1997).

A SCA12 é causada pela expansão CAG na região promotora do gene que codifica a proteína PPP2R2B, uma subunidade reguladora cérebro-específica da enzima fosfatase PP2A, que está envolvida em múltiplas funções celulares (Holmes *et al*, 1999).

Diferentes mecanismos causam ataxia cerebelar e neurodegeneração na SCA5, na SCA13, na SCA14, na SCA17 e na SCA27, onde alterações na composição dos aminoácidos em espectrina beta-III (SPTBN2) (Ikeda *et al*, 2006), canal de potássio KCNC3 (Waters *et al*, 2006), proteína quinase C (PRKCG) (Chen *et al*, 2003; Yabe *et al*, 2003), proteína ligante TATA-box (TBP) (Fujigasaki *et al*, 2001) e fator de crescimento de fibroblasto 14 (FGF14) (van Swieten *et al*, 2003), respectivamente, explicam os sintomas da doença nesses quatro subtipos de SCA. Nas outras SCAs, os genes e, portanto, as mutações, ainda não foram identificados nem caracterizados. O entendimento dos mecanismos patogênicos da neurodegeneração facilitaria a identificação de potenciais alvos terapêuticos e também a descoberta de drogas para um tratamento efetivo (Dueñas *et al*, 2006).

A relação entre neurodegeneração em SCAs e o sistema proteossomo dependente de ubiquitina (SPU), a principal maquinaria celular para degradar proteínas envelhecidas de forma errada, é evidenciada por achados consistentes de agregados protéicos ubiquitinados em estudos neuropatológicos (Ross & Poirier, 2004). Neste sistema, a ubiquitina, um peptídeo de 76 aminoácidos, é ligado à proteína alvo em um ou mais resíduos de lisina pela enzima que conjuga ubiquitina (Ubc E2). As proteínas podem ser mono ou poliubiquitinadas. As proteínas poliubiquitinadas são transportadas ao proteossomo 26S, uma complexa protease nuclear e citosólica com um núcleo proteolítico multicatalítico 20S (Bonifacino & Weissman, 1998; Voges *et al*, 1999). Este sistema é um dos mecanismos chaves para degradar proteínas não necessárias à célula e falhas neste sistema resultam em toxicidade celular (Jesenberger & Jentsch, 2002). Detecção por métodos imunohistoquímicos de ubiquitina e do proteossomo 20S em agregados em células de Purkinje de cérebros de camundongos transgênicos para SCA1 e também em pacientes com SCA1 comprovam que este sistema poderia estar prejudicado em doenças de poliglutaminas (Cummings *et al*, 1998). Outro experimento demonstrou que ataxina 1 contendo somente duas glutaminas e ataxina 1 contendo uma repetição expandida com 92 glutaminas foram ubiquitinadas por uma mesma extensão, mas a ataxina 1 com a expansão foi mais resistente à degradação pelo proteossomo (Cummings *et al*, 1999). Juntos, estes achados levam a hipóteses mais específicas que proteínas com poliglutaminas expandidas são mal envelhecidas e marcadas para a proteólise, mas são resistentes à degradação. Foi observado que a inibição da função proteossomal em diferentes linhagens celulares

transfectadas com um fragmento truncado de ataxina 3 aumentou a agregação da ataxina 3 mutante (Chai *et al*, 1999).

Existem evidências que as ataxinas 1, 3 e 7 são suscetíveis ao processo de ubiquitinação e a serem sinalizadas para degradação no proteossomo (Cummings *et al*, 1999; Matilla *et al*, 2001; Chai *et al*, 2004). Enovelamento errado causado pela poliglutamina expandida poderia levar a dificuldades de reconhecimento pelo SPU e, assim, prejudicar a degradação dessas proteínas mutantes. Alguns estudos indicam que as expansões e os agregados podem também alterar a função SPU. Por exemplo, ataxina 1 expandida parece diminuir a atividade proteossômica em cultura celular (Park *et al*, 2005), e ataxina 3 expandida poderia alterar a função normal e produzir falhas no sistema SPU. Como o SPU desenvolve um papel proeminente na detoxificação e sinalização de proteínas danificadas para degradação, falha neste sistema poderia levar a um acúmulo anormal de uma variedade de proteínas tóxicas, incluindo aquelas contendo as poliglutaminas e, assim, causando disfunção e/ou morte celular (Dueñas *et al*, 2006).

Chaperonas moleculares, proteínas que podem reparar ou facilitar a degradação proteossômica de proteínas mal enoveladas, estão presentes em agregados de tecidos humanos *postmortem* (Ross & Poirier, 2004). Esta evidência indica que os mecanismos de sobrevivência celular mediados por chaperonas do retículo endoplasmático (RE) e a resposta a proteínas mal enoveladas são ativados durante a neurodegeneração nas SCAs. A presença de proteínas mal enoveladas pode causar um estresse no RE e, para restaurar a homeostase, ocorre a ativação transcricional de genes que codificam chaperonas. Consistente com esta hipótese, super-expressão experimental de chaperonas modula a formação de agregados protéicos em cultura celular, camundongos transgênicos e drosófilas, diminuindo a toxicidade da cadeia expandida (Cummings *et al*, 1998; Cummings *et al*, 2001; Bonini, 2002). Um possível mecanismo para as chaperonas modularem a toxicidade seria pela estabilização da conformação das proteínas ou pela interação com a proteína doente, prevenindo interações anormais com outras proteínas celulares (Sakahira *et al*, 2002; Dueñas *et al*, 2006).

Proteínas que permanecem mal formadas também podem ser degradadas pelo sistema fagossomo-lisossomo, um processo celular conhecido como autofagia, que contribui para a renovação dos componentes citoplasmáticos (Shintani & Klionsky, 2004).

Paradoxalmente, autofagia é usada para proteger as células, mas também contribui para a morte celular. O acúmulo de vesículas autofágicas tem sido observado em muitas doenças neurodegenerativas onde existem agregados protéicos. Evidências recentes demonstraram que autofagia desenvolve um papel essencial na liberação celular de proteínas tóxicas agregadas em cultura celular em um modelo de neurodegeneração mediada por ataxina 1 expandida (Iwata *et al*, 2005). Estudos também mostraram que autofagia eficiente degrada agregados insolúveis citoplasmáticos e uma possível estratégia terapêutica poderia modular este processo (Ravikumar *et al*, 2004).

Apesar do fato que a maioria das proteínas associadas a SCAs são expressas sistematicamente, a citotoxicidade resultante parece restrita a poucos subtipos neuronais do sistema nervoso central. Condições celulares seletivas e interações proteína-proteína específicas poderiam conferir condições de insolubilidade local, levando a oligomerização e fibrilação em neurônios vulneráveis. Interferência na expressão gênica poderia ocorrer pelos efeitos da interação da proteína mutante com proteínas que regulam a transcrição. Este fato explicaria a neurodegeneração de tipos específicos de células nas SCAs, pelo seqüestro de fatores cuja expressão está confinada a estas células (Dueñas *et al*, 2006).

Um grupo de proteínas nucleares, cuja expressão poderia ser alterada pelas ataxinas mutantes, é o grupo das histonas acetiltransferases (HATs). As HATs são responsáveis pela acetilação de histonas e de várias outras proteínas, alterando as suas funções (Kouzarides, 2000). As HATs também regulam processos de modificação transcricional de cromossomos, regulação temporária de promotores e ativação e inativação de proteínas. O desequilíbrio entre acetilação e desacetilação de proteínas pode ser um processo chave na patogênese (Steffan *et al*, 2001). A restauração do equilíbrio é possível pela redução genética ou farmacológica do grupo de enzimas com atividade contrária, as histonas desacetilases (HDACs). Novas estratégias terapêuticas sugerem a utilização de inibidores de histonas desacetilases (HDACis) para tratar a neurodegeneração (McCampbell *et al*, 2001; Steffan *et al*, 2001; Hockly *et al*, 2003).

A compreensão das funções normais das proteínas doentes associadas a ataxias espinocerebelares é essencial para a descoberta dos mecanismos moleculares que causam os efeitos deletérios das mutações. Na SCA1, somente a expansão de poliglutaminas não é suficiente para causar a doença. Parece que a fosforilação de um resíduo de serina

específico na ataxina 1 pela proteína B/Akt desenvolve um papel crucial na indução da neurodegeneração pela forma mutante da proteína, por influenciar suas interações biológicas com outras proteínas e pela formação de NII (Chen *et al*, 2003c). Portanto, o contexto protéico com o qual a ataxina 1 normalmente interage é importante no processo da doença, indicando que, por exemplo, o bloqueio de eventos de fosforilação seria um tratamento viável (van de Warrenburg *et al*, 2005).

Alguns estudos também indicam que NII pode não ser a causa direta da doença, podendo ser um fenômeno relacionado ou mesmo representar uma resposta protetora. Após a interrupção da função da ubiquitina, poucas inclusões são observadas, mas a neurodegeneração procede (Cummings *et al*, 1999). As proteínas mutantes poderiam ser mais tóxicas se não forem seqüestradas em inclusões. Estudos animais desenvolvendo o modelo NII poderão esclarecer a sua relação com a morte celular (Schelhaas *et al*, 2000).

As pesquisas realizadas até agora sugerem que as expansões de repetições causam doenças neurodegenerativas por um dos três mecanismos: toxicidade da poliglutamina, alteração da função protéica normal ou alteração da expressão gênica. Muitas questões ainda devem ser respondidas para elucidar os mecanismos patogênicos e para buscar terapias efetivas com possibilidade de cura.

1.3.4. Antecipação

A idade de início da doença varia bastante, geralmente ocorrendo entre a terceira e a quarta década de vida, apesar de terem sido descritos casos com início precoce, durante a infância, e com início tardio, após sessenta anos de idade. A doença evolui progressivamente, levando o paciente a falecer 10 a 20 anos após o início dos sintomas (Khati *et al*, 1993; Ramesar *et al*, 1997).

Um fenômeno chamado antecipação ocorre nas SCAs com repetições trinucleotídicas CAG. Seqüências com repetições grandes, maiores que a faixa normal, são instáveis durante a meiose e tendem a se expandir nas próximas gerações. Isto leva ao início mais precoce dos sintomas e fenótipo mais severo em gerações subseqüentes da família, que caracteriza antecipação (Richards, 2001). A maioria dos casos juvenis é

causada por expansões extremas entre as gerações, como observadas em esperma em casos de SCA7 e de SCA2 (Monckton *et al*, 1999; Benton *et al*, 1998). Na SCA7, antecipação pode ser tão grave que crianças com início precoce podem morrer antes mesmo dos pais tornarem-se sintomáticos (La Spada, 1997; Nance, 1997).

Para expansões de repetições grandes, como na SCA3, instabilidade somática também poderia ocorrer, fazendo uma correlação genótipo-fenótipo ainda mais problemática (Maciel *et al*, 1997). Por outro lado, pequenas expansões, que algumas vezes são próximas ao tamanho normal, como na SCA2 e na SCA6, podem apresentar penetrância reduzida e aparecer como casos esporádicos sem uma história familiar (Schöls *et al*, 2000).

Antecipação é uma questão importante no aconselhamento genético de indivíduos em risco assintomáticos e no diagnóstico pré-natal. Porém, embora exista uma correlação inversa entre o número de repetições CAG e a idade de início da doença, não se pode prever pela história familiar ou por testes moleculares com qual idade os sintomas começarão a aparecer, assim como a severidade, os sintomas específicos e a taxa de progressão da doença, já que estes fatores são variáveis entre os indivíduos. É importante lembrar que o número de repetições trinucleotídicas pode também permanecer estável ou mesmo diminuir quando transmitido para gerações subseqüentes (Bird, 2006).

1.3.5. Prevalência mundial

Dados epidemiológicos sobre a prevalência das SCAs são restritos a poucos estudos em regiões geograficamente isoladas e a maioria não reflete a real ocorrência destas doenças. A prevalência internacional estimada de SCA varia de 0,3 a 3,0 em 100.000 (van de Warrenburg *et al*, 2002). Contudo, as freqüências relativas de algumas SCAs variam significativamente de acordo com a população e o local de nascimento, provavelmente devido a um efeito fundador², como demonstrado em um grande estudo de haplótipos da doença de Machado-Joseph (SCA3) (Gaspar *et al*, 2001). Um efeito fundador também pode ser observado na SCA2 entre cubanos (Velazquez-Perez *et al*,

² Viés genético devido a genótipos de indivíduos fundadores em uma população.

2001); SCA3 entre portugueses e brasileiros (Sequeiros *et al*, 1993) e SCA10 entre mexicanos (Matsuura *et al*, 2002).

Dados recentes sugerem que a SCA3 é o subtipo mais comum, com uma prevalência de aproximadamente 30% em todo o mundo (Schöls *et al*, 2004). SCA1, SCA2, SCA6, SCA7 e SCA8 tem uma prevalência acima de 2% e as SCAs restantes são consideradas raras (prevalência <1%) (Bird, 2006). Este quadro deve ser ajustado, já que alguns genótipos “raros”, como a SCA14 e a SCA17, não foram incluídos em estudos populacionais prévios. Além disso, para *loci* gênicos que foram atribuídos a uma região cromossômica, mas para os quais o gene ainda não foi identificado (Tabela 4), dados epidemiológicos são poucos por causa da falta de famílias grandes apropriadas para análise de ligação. A proporção de pacientes não diagnosticados com SCA em grandes estudos pode variar de 1/3 (Estados Unidos, Holanda, Japão) a 1/5 (Brasil) (Silveira *et al*, 2002). As frequências das SCAs e DRPLA em várias populações estão listadas na Tabela 6.

A frequência estimada de indivíduos afetados com SCA3, em um estudo prévio realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, foi de 1,8/100.000 e a frequência de outras SCAs, exceto SCA3, foi de 0,2/100.000 (Jardim *et al*, 2001b). A proporção de casos da doença de Machado-Joseph foi bastante elevada, provavelmente refletindo um efeito fundador açoriano (Jardim *et al*, 2001b). Em um recente estudo realizado com 114 famílias provenientes do sul do Brasil, a SCA3 foi identificada em 96 (84%) famílias (Figura 1) (Trott *et al*, 2006).

É importante definir a prevalência e a frequência das SCAs para desenvolver uma estratégia efetiva de diagnóstico molecular para cada grupo étnico.

Tabela 6. Frequências das SCAs e DRPLA em várias populações.

População	N	SCA1 (%)	SCA2 (%)	SCA3 (%)	SCA6 (%)	SCA7 (%)	SCA8 (%)	DRPLA (%)	Referência
Alemanha	77	9	10	42	22	NT	NT	NT	Schöls <i>et al</i> , 1997
EUA	178	6	15	21	15	4	4	NT	Moseley <i>et al</i> , 1998; Mosemiller <i>et al</i> , 2003
Japão (central)	101	NE	6	34	6	NT	NT	20	Watanabe <i>et al</i> , 1998
Japão	117	25	1	24	10	2	1	15	Onodera <i>et al</i> , 2000
Japão (norte)	155	10	8	24	29	NE	NE	3	Sasaki <i>et al</i> , 2000; Sasaki <i>et al</i> , 2003
Espanha	72	6	15	15	1	3	NT	1	Pujana <i>et al</i> , 1999
Índia	57	10	18	7	2	NE	NT	NE	Basu <i>et al</i> , 2000
México	28	NE	43	7	NE	11	NE	NE	Rasmussen <i>et al</i> , 2000
Itália	116	24	47	NE	2	2	NT	1	Filla <i>et al</i> , 2000
Austrália	88	16	6	12	17	2	NT	NE	Storey <i>et al</i> , 2000
China	85	5	6	48	NE	NE	NT	NE	Tang <i>et al</i> , 2000
Formosa	74	5	11	47	11	3	NE	1	Soong <i>et al</i> , 2001
Portugal	145	NE	5	53	NE	NE	9	3	Silveira <i>et al</i> , 2002
África do Sul	54	41	13	4	2	22	NT	NT	Bryer <i>et al</i> , 2003
Finlândia	251	0,8	0,4	NE	0,4	3	9	NE	Juvonen <i>et al</i> , 2005
República Checa	118	2	11	NE	NE	NE	NT	NT	Bauer <i>et al</i> , 2005b

N: número de famílias; NE: não encontrado; NT: não testado

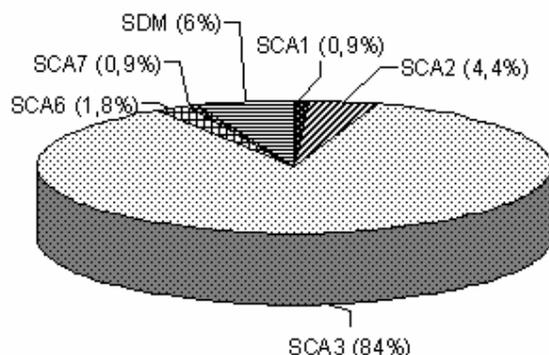


Figura 1. Frequências das SCAs em famílias brasileiras (SDM: sem diagnóstico molecular) (adaptado de Trott *et al*, 2006)

1.3.6. Alelos normais grandes

A base molecular das diferenças nas prevalências das SCAs inter e intra-populações não é clara. Evidências de diversos estudos sugerem que a prevalência de várias SCAs pode estar associada com a presença de alelos normais grandes (ANGs) nos respectivos *loci*.

Estudos com distrofia miotônica, doença de expansão de repetições CTG, mostraram que a distribuição de alelos normais com muitas repetições está diretamente correlacionada com a prevalência da doença. Esta é uma característica das mutações dinâmicas em geral, onde o tamanho da expansão inicial determina a taxa da expansão futura. Isto leva a hipótese que alelos com número grande de repetições CTG, dentro da variação normal (os ANGs), são relativamente instáveis e passam por um processo de expansão que alcança uma extensão intermediária, do qual expansões futuras conduzem a um tamanho patogênico. Portanto, um estudo do percentual de alelos normais grandes numa determinada população seria um reflexo indireto da prevalência da doença nesta população. Isto foi demonstrado em populações africanas e israelenses (Goldman *et al*, 1996; Mor-Cohen *et al*, 1997).

Na doença de Huntington (DH), doença neurodegenerativa causada por expansão de repetições CAG, novos alelos expandidos (AEs) podem originar-se de alelos normais com números de repetições CAG maiores que os alelos geralmente encontrados em indivíduos normais, mas menores que os observados em indivíduos afetados (esta categoria é chamada de alelos intermediários - AIs) (Goldberg *et al*, 1995; Myers *et al*, 1993). Análise haplotípica demonstrou que a maioria desses AIs compartilha o mesmo haplótipo dos AEs em populações caucasianas (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Squitier *et al*, 1994), sugerindo que estes AIs servem como um reservatório para a produção de novos AEs e que a frequência de AIs em várias populações contribui para variações na prevalência de DH nas populações correspondentes (Squitier *et al*, 1994). Por exemplo, enquanto que a prevalência de DH é 1 em 10.000 em *East Anglia* (Reino Unido), na população japonesa ela é relativamente rara (1 em 1.000.000). Esta observação é consistente com o fato que indivíduos japoneses normais mostram escassez significativa de alelos grandes no *locus* da DH comparado com *East Anglians* (Basu *et al*, 2000).

Alguns estudos sugerem que ANGs representam um reservatório para expansões patológicas nas SCAs (Takano *et al*, 1998; Storey *et al*, 2000). Esta pressuposição é reforçada pelo fato que a maioria desses alelos possui o mesmo haplótipo que os AEs (Stevanin *et al*, 1997; Gaspar *et al*, 2001). Por exemplo, analisando dois polimorfismos intragênicos em pacientes com SCA3, a maioria dos AEs observados tinha um haplótipo comum C-A, similar àquele presente nos ANGs (Igarashi *et al*, 1996; Stevanin *et al*, 1997). Para o polimorfismo intragênico 987G → C no gene MJD1, o elemento CGG em *cis* confere a instabilidade da expansão CAG. O haplótipo resultante da justaposição da expansão CAGn-CGG com o normal CAGn-GGG foi também associado com níveis significativamente mais altos de instabilidade quando comparado com outras combinações de haplótipos, sugerindo uma interação alélica entre a repetição CAG normal e a repetição CAG expandida (Igarashi *et al*, 1996).

Um estudo envolvendo pacientes caucasianos e japoneses com ADCA e indivíduos normais mostrou que a prevalência das SCAs está altamente correlacionada com a frequência de ANGs na população normal. O estudo de Takano e colaboradores (1998) sugeriu que alelos patogênicos podem ser originados pela expansão de alelos não patogênicos grandes. Esse estudo descreveu que as prevalências da SCA1 e da SCA2 foram significativamente mais altas em famílias caucasianas (15% e 14%,

respectivamente) que em famílias japonesas (3% e 5%, respectivamente), correspondendo à observação que as frequências de ANGs em SCA1 (>30 repetições e > 31 repetições) e em SCA2 (>22 repetições) foram significativamente mais altas em caucasianos que em japoneses. A prevalência relativa da SCA3, da SCA6 e de DRPLA foi significativamente mais alta em famílias japonesas (43%, 11% e 20%, respectivamente) que em famílias caucasianas (30%, 5% e 0%, respectivamente) correspondendo à observação que as frequências de ANGs de SCA3 (>27 repetições), SCA6 (>13 repetições) e DRPLA (>17 repetições) foram significativamente mais altas em japoneses que em caucasianos (Takano *et al*, 1998).

1.3.7. Diagnóstico

O diagnóstico diferencial de ataxia hereditária inclui causas não genéticas de ataxia, como lesão que ocupa o espaço cerebelar, alcoolismo, hipotireoidismo, doença desmielinizante, deficiência de vitamina E, esclerose múltipla, doenças vasculares, tumores primários ou metastáticos ou doença neoplásica associada com carcinoma oculto de ovário, mama ou pulmão. A possibilidade de uma causa adquirida de ataxia precisa ser considerada em cada caso individual para que um tratamento específico possa ser avaliado (Bird, 2006; Lau *et al*, 2004).

As SCAs não são facilmente diferenciadas baseadas nas manifestações clínicas por apresentarem expressão variada e fenótipos neurológicos semelhantes. Embora algoritmos (Figura 2) possam prever a probabilidade do tipo específico de SCA (Schelhaas *et al*, 2000; Tan *et al*, 2001), um diagnóstico exato depende de testes moleculares que detectam uma mutação no gene causador específico (Schelhaas *et al*, 2000).

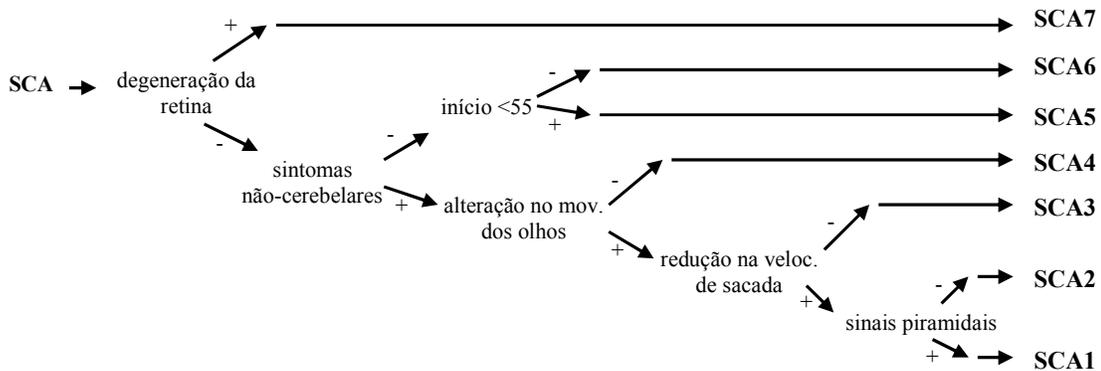


Figura 2. Algoritmo utilizado para o diagnóstico diferencial de SCAs (adaptado de Schelhaas *et al*, 2000).

A caracterização molecular dos diferentes genes associados a SCAs conduziu ao desenvolvimento de testes sensíveis e específicos para a análise direta do DNA usando a reação em cadeia da polimerase. Como os sintomas dessas doenças se sobrepõem e há uma intensa variabilidade fenotípica, esta ferramenta molecular se tornou útil para o diagnóstico diferencial e confirmatório, bem como para a testagem preditiva. A identificação correta da patologia torna possível a aplicação de terapias apropriadas e de um aconselhamento genético adequado.

Tipicamente, testes moleculares para SCAs utilizam um painel com testes para os tipos mais prevalentes de SCAs numa determinada população. Se existe uma forte suspeita clínica de um diagnóstico específico (por exemplo, presença de retinopatia sugerindo SCA7) ou se a história familiar é positiva para um tipo conhecido, a testagem pode ser realizada para uma única doença.

Os testes geralmente utilizam reações de amplificação de regiões gênicas individuais, detecção do número de repetições através da eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose e comparação pela co-migração de um marcador de peso molecular (Figura 3).

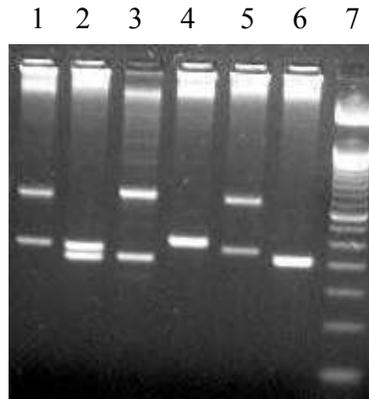


Figura 3. Detecção molecular da doença de Machado-Joseph (ou SCA3). Eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) para identificação da porção do gene SCA3 contendo a região polimórfica do trinucleotídeo CAG. Coluna 1: controle positivo; colunas 2, 4 e 6: amostras com alelos normais; colunas 3 e 5: amostras com um alelo normal e um alelo expandido; coluna 7: marcador de peso molecular de 50pb.

Algumas SCAs estão associadas com AIs, nos quais existe sobreposição entre repetições grandes dentro da faixa normal e repetições pequenas dentro da faixa patológica. Estes AIs podem apresentar certa dificuldade no diagnóstico laboratorial, representando uma “zona cinza” biológica, no qual o alelo pode ou não estar associado com problemas fenotípicos (Bird, 2006).

O teste preditivo de adultos assintomáticos em risco (parentes de indivíduos com alguma SCA) pode ser realizado após a identificação da mutação específica causadora da doença no probando. Esse teste não é útil para prever a idade de início, a severidade, os tipos de sintomas ou a taxa de progressão da doença em indivíduos assintomáticos.

A testagem durante a infância para doenças de início tardio sem tratamento não é apropriada na ausência de sintomas. Os principais argumentos para não testar indivíduos menores que 18 anos de idade não sintomáticos é a interferência na sua escolha de saber ou não esta informação, podendo causar estigmatização na família e em outros grupos sociais, podendo também ter sérias implicações educacionais. Indivíduos que são sintomáticos durante a infância podem se beneficiar tendo um diagnóstico específico estabelecido (*American Society of Human Genetics and The American College of Medical Genetics, 1995*).

O diagnóstico pré-natal para algumas SCAs é possível pela análise de DNA fetal extraído de células de vilosidades coriônicas com 10-12 semanas de gestação ou amniocentese, geralmente feita com 15-18 semanas de gestação. O gene causador da doença na família deve ter sido identificado previamente. O diagnóstico molecular pré-implantação também já é possível. Drüsedau e colaboradores (2004) desenvolveram um protocolo de PCR para análise de SCA3 em uma única célula embrionária. Embriões não afetados podem, assim, ser implantados.

Para uma melhor orientação de pacientes que procuram os serviços de genética é realizado um programa de aconselhamento genético antes da realização do teste. A *World Federation of Neurology* criou um “*guidelines*” sobre as recomendações que devem ser fornecidas aos pacientes. As recomendações refletem princípios éticos baseados no conhecimento e nas técnicas atuais de genética molecular e são as seguintes:

1. Todo indivíduo que quiser fazer o teste deve receber informações atualizadas e relevantes para, informado, dar seu consentimento voluntário.

2. Fazer o teste é uma decisão única e exclusiva do indivíduo interessado. Não devem ser consideradas solicitações de terceiros (familiares do indivíduo ou não).

3. O participante deve ser encorajado a escolher uma pessoa para acompanhá-lo em todas as etapas do processo de teste: a etapa pré-teste, a realização do teste, a comunicação do resultado e a etapa pós-teste.

4. O teste e o aconselhamento devem ser feitos em unidades especializadas em aconselhamento genético, conhecedoras dos aspectos de genética molecular das SCAs, de preferência em um departamento universitário. Esses centros devem trabalhar em estrita colaboração com organizações leigas do país.

1.3.8. Estratégias terapêuticas

Atualmente, não existe nenhum tratamento efetivo para modificar a progressão da doença nas SCAs ou nas doenças neurodegenerativas relacionadas, embora alguns benefícios no alívio dos sintomas atáxicos foram descritos em alguns ensaios clínicos; alguns deles serão citados a seguir.

Acetazolamida reduziu temporariamente a gravidade dos sintomas na SCA6 (Yabe *et al*, 2001). Drogas dopaminérgicas e anticolinérgicas são usadas para aliviar tremores, bradicinesia ou distonia na SCA2 e SCA3 (Buhmann *et al*, 2003; Nandagopal & Moorthy, 2004). Espasticidade nas SCAs poderia ser tratada efetivamente com baclofen, tizanadina ou mimentina. Em alguns casos selecionados, nos quais outros tratamentos falharam, toxina botulínica foi usada com sucesso para tratar distonia e espasticidade. Câimbras musculares, que estão freqüentemente presentes no início da doença na SCA2, SCA3, SCA7 e DRPLA, são aliviadas com magnésio ou mexiletina. Dados preliminares de um recente ensaio clínico com gabapentina mostraram melhora nos sintomas cerebelares em pacientes atáxicos pelo aumento da concentração de GABA no sistema nervoso central e, assim, por estimular a neurotransmissão GABAérgica (Gazulla *et al*, 2004).

Muitos estudos usando RNAi para suprimir genes de doenças autossômicas dominantes são feitos em cultura celular. Contudo, trabalhos mais recentes estão sendo realizados *in vivo*, em modelos de camundongos para doenças neurodegenerativas cerebrais. Atualmente, a entrega mais efetiva de RNAi no cérebro é através de vírus recombinante que expressa um pequeno RNA contra o gene alvo, levando a supressão deste e corrigindo o fenótipo (Paulson, 2006). O melhor exemplo até o momento é de terapia mediada por RNAi para SCA1. Injeção intracerebelar de vírus adeno-associado recombinante expressando pequenos RNAs melhorou significativamente a coordenação motora, restaurando a morfologia cerebelar e eliminando inclusões de ataxina 1 em células de Purkinje de camundongos transgênicos (Xia *et al*, 2004). Estudos também têm demonstrado que silenciamento alelo específico pode ser possível, mesmo quando os alelos normais e doentes diferem em um único trinucleotídeo. Testes já foram realizados para supressão seletiva na SCA3 (Paulson, 2006). Enquanto estes resultados com terapia de RNAi melhoram as características de comportamento celular, sua aplicação em pacientes para proteger ou mesmo reverter o fenótipo doente deve aguardar a realização de testes apropriados de toxicidade.

As chaperonas moleculares representam a primeira linha de defesa contra proteínas defeituosas e agregados protéicos, sendo direcionadas a diferentes alvos. Muitos estudos vêm analisando os efeitos da super-expressão de chaperonas em corpos de inclusão nucleares e na toxicidade de fragmentos de poliglutamina patogênicos em cultura celular e demonstram que estes efeitos poderiam ser benéficos para o tratamento de doenças

neurodegenerativas (Muchowski & Wacker, 2005). Elas preveniram interações inapropriadas entre polipeptídeos, promovendo um eficiente enovelamento protéico de proteínas resultantes de mutações e estresse celular (Chan *et al*, 2000). Alguns compostos como congo vermelho, tioflavina S e crisamina G são efetivos em suprimir a agregação *in vitro* e *in vivo* (Heiser *et al*, 2000; Sanchez *et al*, 2003). Diversos compostos de baixa massa molecular, tais como o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, óxido de trimetilamina e trealose, aumentam a estabilidade de proteínas em sua conformação nativa; por esse motivo são chamados chaperonas químicas por influenciarem o enovelamento protéico. Estas substâncias são efetivas na prevenção de morte celular pela ataxina 3 mutante (Yoshida *et al*, 2002).

Mais recentemente, uma nova geração de pequenos compostos químicos que agem diretamente na agregação sem significativa toxicidade foram identificados (Heiser *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2005). Por um mecanismo diferente, uma pequena molécula, o arimoclomol, que atua como um co-indutor de resposta ao choque térmico por prolongar a atividade do fator de transcrição de choque térmico HSF1, melhorou significativamente o fenótipo, previniu a perda neuronal, aumentou a sobrevivência e retardou a progressão da esclerose lateral amiotrófica em um modelo murino de neurodegeneração (Kieran *et al*, 2004). De forma similar, ativação de resposta ao choque térmico com geldanamicina inibe a agregação e previne a morte celular (Rimoldi *et al*, 2001). Isto sugere que a ativação farmacológica da resposta ao choque térmico, portanto, pode ser um método terapêutico efetivo para tratar doenças neurodegenerativas. Contudo, estímulo excessivo de chaperonas poderia levar a efeitos adversos, tais como alterações na regulação do ciclo celular e câncer (Mosser & Morimoto, 2004). Portanto, um delicado balanço de chaperonas é necessário para um efeito neuroprotetor benéfico.

O papel que algumas ataxinas desenvolvem na transcrição e, mais importante, a supressão de efeitos citotóxicos mediados por alguns de seus reguladores, pode ser usado para modular os efeitos patológicos das ataxinas mutantes, abrindo o caminho para novos tratamentos para algumas das SCAs. Progressos recentes na pesquisa de HDAC têm tornado possível o desenvolvimento de inibidores de proteínas específicas da família HDAC e estes compostos seriam candidatos para o tratamento de ataxias espinocerebelares (Dokmanovic & Marks, 2005).

Terapia gênica e de células tronco estão sendo consideradas para o tratamento de neurodegenerações espinocerebelares. Terapias de substituição de células neurais são baseadas na idéia que a perda da função neurológica durante a neurodegeneração poderia ser melhorada pela introdução de novas células que poderiam formar conexões apropriadas e substituir a função dos neurônios perdidos. Esta estratégia tem mostrado ser efetiva no tratamento de neurodegeneração em doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Svendsen & Langston, 2004). Células-tronco embrionárias, tanto humanas como de camundongos, quando cultivadas *in vitro* para produzir corpos embrióides, são capazes de se diferenciar em linhagens de neurônios motores (Wichterle *et al*, 2002). Extraordinariamente, quando estes neurônios são introduzidos no córtex espinhal prejudicado, alguns neurônios motores derivados de células-tronco formam axônios e inervam os locais apropriados. Já que a neurogênese ocorre no sistema nervoso adulto, outro método poderia ser o estímulo de células-tronco endógenas no cérebro ou cordão espinhal para produzir novos neurônios. Estudos para entender os determinantes moleculares que estimulam as células-tronco endógenas estão avançando (Gage, 2002).

Enquanto estudos avançam em busca de tratamentos para uma possível cura, alguns dispositivos adaptados são utilizados para melhorar a qualidade de vida e permitir ao indivíduo manter tanta independência quanto for possível. Tais dispositivos podem incluir bengalas, muletas, andadores ou cadeiras de rodas para aqueles com dificuldades de caminhar; dispositivos para auxílio na escrita, na alimentação e nos cuidados pessoais para aqueles com dificuldades na coordenação de mãos e braços, e aparelhos de comunicação para aqueles com dificuldades de fala.

1.4. Justificativa

O Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre realiza análises moleculares para caracterização das expansões trinucleotídicas em pacientes com suspeita clínica de uma SCA. Entretanto, essas análises são realizadas em reações independentes em gel de agarose, o que torna o procedimento mais demorado. Esse procedimento não permite a identificação precisa do número de

repetições CAG nos alelos, especialmente importante para a determinação do tamanho de alelos intermediários.

No Brasil, ainda não existem publicações que utilizam PCR-multiplex e eletroforese capilar para o estudo de mutações dinâmicas. Além disso, a investigação da correlação dos alelos normais grandes com a frequência das SCAs no sul do Brasil, proposta neste projeto, é de grande importância clínica, visto que são mutações dinâmicas e que as repetições podem se expandir para um estado patológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- Analisar os polimorfismos de repetições trinucleotídicas nos genes associados as ataxias espinocerebelares tipo 1, tipo 2, tipo 3 e tipo 6 através de PCR-multiplex e eletroforese capilar.

2.2. Objetivos Específicos

- Validar a metodologia proposta para detectar a presença de alelos expandidos e alelos normais nas amostras analisadas.
- Determinar a distribuição dos alelos normais na população analisada.
- Comparar as frequências dos alelos normais grandes com a frequência relativa das SCAs em cada *locus*.
- Transferir a tecnologia padronizada como rotina laboratorial para avaliar pacientes que apresentem sinais e/ou sintomas de alguma SCA.

3. ARTIGO

Os resultados deste trabalho serão apresentados sob forma de um manuscrito que será submetido à publicação no periódico *Human Genetics*.

**Analysis of CAG repeats length in normal and mutant alleles in SCA1, SCA2, SCA3
and SCA6 loci of patients' clinical suspicion of spinocerebellar ataxia.**

Vanessa Erichsen Emmel, Alexis Trott, Laura Bannach Jardim,

Maria Luiza Saraiva-Pereira

Department of Genetics – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
Brazil

Medical Genetics Service – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Laboratory of Genetics Identification – Research Center – Hospital de Clínicas de Porto
Alegre, Brazil

Department of Internal Medicine – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, Brazil

Department of Biochemistry – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
Brazil

Key words: CAG repeat; spinocerebellar ataxias; multiplex PCR; capillary electrophoresis.

Address to correspondence:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Genética Médica

Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90035-903

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Phone: 55 51 21018011

Fax: 55 51 21018010

Abstract

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are neurodegenerative disorders that present broad genetic and clinical heterogeneity. An accurate diagnosis relies on detection of a mutation in a specific causative gene, which is typically an abnormal number of CAG trinucleotide repeats. The aim of this study was to evaluate whether SCAs relative prevalences correlate with frequencies of large normal alleles at the respective loci in the Brazilian population, using a rapid and precise method to quantify CAG repeats length in SCA1, SCA2, SCA3 and SCA6 gene by PCR-multiplex using fluorescent primers and capillary electrophoresis. Analyses were carried out in 124 unrelated Brazilian patients who presented symptoms of progressive ataxia. We identified 10 patients with SCA2, 39 patients with SCA3, and 2 patients with SCA6. No alleles were identified with a CAG expansion tract in the SCA1 gene. Normal CAG repeats length range was established using data from normal chromosomes (n=209-248). Frequency of large normal alleles in SCA1 locus (>32 CAG repeats) was determined to be 0.05, while in SCA2 locus (>22 CAG repeats) was 0.11, in SCA3 locus (>28 repeats) was 0.11, and in SCA6 locus (>13 CAG repeats) was found to be 0.04. Moreover, frequency of large normal alleles in SCA3 and SCA6 genes established in this sample reflects the prevalence of these two diseases in our population, supporting the hypothesis that disease alleles emerge from expansion of large normal alleles.

Introduction

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are autosomal dominant disorders that display clinical and genetic heterogeneity. These neurodegenerative disorders show late-onset and progressive deterioration in balance and coordination as well as cerebellar ocular disturbance. Over 28 distinct types have been described based on identification of different causative genes or chromosomal loci (Bird, 2006). In seven SCA subtypes, the genetic defect has been established to be an expansion of CAG trinucleotide repeats in the coding region of SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, and DRPLA genes. The expanded segment is translated into an abnormal polyglutamine tract in the protein, leading to the formation of nuclear aggregates that have been considered the basis of the pathogenesis in most of SCA types (Costa Lima & Pimentel, 2004).

Frequency of each SCA varies between regions and ethnic groups. However, Machado–Joseph disease (MJD/SCA3) is by far the most common SCA worldwide, being even more common among populations with Portuguese and Azorean background, and among Japanese and Germans (Silveira *et al*, 1996; Jardim *et al*, 2001b; Watanabe *et al*, 1998; Schöls *et al*, 1997). SCA frequencies were previously evaluated in Brazil, and expansion at SCA3 locus was observed in 84% of SCA patients, followed by expansion at SCA2 locus in 4% of patients (Trott *et al*, 2006).

SCA disorders cannot be reliably differentiated based only on clinical symptoms due to variable expression and phenotypic overlap. Although algorithms may predict the likelihood of a specific type of SCA (Schelhaas *et al*, 2000; Tan & Ashizawa, 2001), an accurate diagnosis depends upon molecular testing, which detects a mutation in the specific causative gene. Typically, testing for SCA disorders employs a panel that includes

individual assays for more prevalent types of SCA, for example SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, and SCA7 in the Brazilian population. Molecular testing commonly employs individual amplification of CAG-repeat motif containing region of each genes, being labour intensive and often using hazardous reagents.

A previous study has shown evidence that new mutations arise from large normal alleles, and therefore, frequency of these alleles in the population has been suggested to correlate with prevalence of respective SCAs (Takano *et al*, 1998). Therefore a study on the percentage of large normal alleles in any population would be an indirect reflection of the prevalence of the disease in that population (Basu *et al*, 2000).

We present here a protocol to quantify CAG repeats length in SCA1, SCA2, SCA3, and SCA6 genes by PCR-multiplex using fluorescent primers and capillary electrophoresis. This protocol was applied to (i) identify mutant alleles and (ii) determine frequency of normal alleles and correlate SCA prevalences with frequencies of large normal alleles at the respective loci in the Brazilian population.

Material and Methods

Patients

A total of 124 unrelated individuals from Southern Brazil (Rio Grande do Sul state) were examined by Neurogenetics Ambulatory of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. These patients show progressive ataxia as the main clinical feature. Neurological examination was performed as described previously (Jardim *et al*, 2001a). In addition, we have also included samples from 8 confirmed SCA patients, 2 patients with SCA1, 2 with SCA2, 2 with SCA3, and 2 with SCA6; as number of CAG repeats from both normal and mutant alleles were previously determined, these samples were used as control. This study has been approved by the hospital Ethical Committee.

Blood samples (5mL) from each individual were collected in EDTA. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes, using the salting-out technique as described previously (Miller *et al*, 1998). The fluorescence-based assay (Quant-iT - Invitrogen) was used for quantitation of DNA samples.

Fragments of interest of SCA1, SCA2, SCA3 and SCA6 genes, including CAG repeats, were simultaneously amplified by PCR using the primers published previously (Orr *et al*, 1993; Pulst *et al*, 1996; Kawaguchi *et al*, 1994; Zhuchenko *et al*, 1997). One primer from each pair was labelled on its 5' end with fluorescent dye as follows: Rep2 with 6-FAM (6-carboxyfluorescein), SCA2-A with VIC, MJD25 and S-5-F1 with NED (2,7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7,-trichloro-5-carboxyfluorescein). Although SCA3 and SCA6 genes were labeled with same dye, protocol was designed in such way that sizes of respective PCR fragments do not overlap.

Multiplex PCR reaction was performed in a final volume of 25 μL containing 200 ng of genomic DNA; 15.0 pmol of each Rep1/Rep2; 5.0 pmol of each SCA2-A/SCA2-B and S-5-F1/S-5-R1; 20.0 pmol of each MJD52/MJD25; 400 μM dNTPs (Amersham-Pharmacia); 15 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl (PCR Buffer II - Applied Biosystems); 2.3 mM MgCl_2 ; 10% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO); and 2 units of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems).

Amplification was performed in a thermal cycler as follows: initial denaturation and polymerase activation at 95°C for 10min followed by 5 cycles at 94°C for 30s and 72°C for 3min, 5 cycles at 94°C for 30s and 70°C for 3min, 5 cycles at 94°C for 30s and 68°C for 3min, and 20 cycles at 94°C for 30 s, 56°C for 1min and 68°C for 3min, and final extension at 68°C for 45min.

An aliquot of PCR products (0.5 μL) were mixed with 9.0 μL formamide (HiDye formamide, Applied Biosystems) and 0.5 μL GeneScan-500 ROX (Applied Biosystems). Samples were denatured at 95°C for 5min and immediately placed on ice for 5 min. Electrophoresis was performed in an ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using a 36cm X 50 μm capillary containing Performance Optimized Polymer-4 (POP-4, Applied Biosystems). Samples were injected during 22s at 3.0 kV and electrophoresed at 15 kV for 40 minutes at 60°C. Amplicon lengths were calculated by comparison with the GeneScan500-ROX molecular weight by the Genescan 3.7 software (Applied Biosystems).

Allele frequencies of each locus were estimated by gene count method. Statistical analysis was performed with WINPEPI program (Abramson, 2004). Chi-square analysis with Yates' correction and Fisher exact test were used to compare frequencies of large

normal alleles of various SCA genes and SCA diseases between Brazilian and other population groups. The null hypothesis was rejected at $P < 0.05$.

Results

Multiplex PCR amplification was performed using touchdown strategy, which was previously shown to be suitable for all primers in separate reactions. Assay parameters were changed to optimize multiplex amplification and capillary electrophoresis analysis. All labeled fragments showed a smaller length than expected, with a mobility shift of 6 bp. These fragments were analysed by sequencing and mobility shift was confirmed to be artifactual. These results were also verified by semi-quantitative analysis performed in conventional agarose gel electrophoresis previously established in our laboratory.

We have tested 124 samples and identified 10 patients with SCA2, 39 patients with SCA3, and 2 patients with SCA6. No alleles were identified with a CAG expansion tract in the SCA1 gene. Distribution of mutant alleles were as follows: 37 to 47 CAG repeats for SCA2, 65 to 88 CAG repeats for SCA3, and length of expanded alleles in the SCA6 gene were determined to be 22 and 26 CAG repeats.

Normal CAG repeats length range of each SCA loci as well as most frequent allele and observed heterozygosity were determined. SCA1, SCA3, and SCA6 loci were observed to be highly polymorphic.

CAG repeat sizes distribution in normal alleles for SCA1, SCA2, SCA3, and SCA6 loci in our sample are shown schematically in Figure 1. At SCA1 locus, observed heterozygosity was determined to be 0.77, with allele range varying from 22 to 35 repeats in 248 chromosomes analysed. Twelve different alleles were observed in this sample, and the 30-repeat allele showed the highest frequency (0.35). No alleles with 24 or

25 repeats were observed. Mean of CAG repeats was 30.02, with a variance of 2.95 (Figure 1a). For SCA2 locus, observed heterozygosity was 0.22 considering 237 chromosomes, with allele range varying from 14 to 29 repeats. The most frequent allele was the 22-repeat one (0.86), and alleles with 10 different CAG lengths were found in this sample population. Mean of CAG repeats was 22.05, with a variance of 1.20. We found one 14-repeat allele at the SCA2 locus in our sample population (Figure 1b). At the SCA3 locus, the range of CAG repeats varied from 15 to 39 repeats, with 19 alleles in the population (Figure 1c). The 24-repeat allele was the most frequent (0.3) in the sample of 209 chromosomes. Heterozygosity at this locus was established to be 0.75. Mean of CAG repeats was 23.04, with a variance of 30.54. Analysis of 246 chromosomes for SCA6 locus showed an observed heterozygosity of 0.69, being the 11-repeat allele the most frequent (0.39). In total, alleles of eight different lengths were found, ranging from 4–15 CAG repeats. Mean of CAG repeats was 11.61, with a variance of 2.67 (Figure 1d).

Figure 1

To study the frequency of large normal alleles at the various loci, we used the criteria proposed by Takano *et al.* (1998), defined as those that correspond to about 5-10% of the upper tail. We have determined CAG repeat length of >32 repeats in SCA1, >22 in SCA2, >28 in SCA3, and >13 in SCA6 to be the large normal alleles in our sample population.

The χ^2 test was performed between our sample population and other populations to determine whether the variation in frequencies of large normal alleles was significant between any pair (Table 1). The studied chromosomes were selected from non-disease chromosomes of patients with a type of SCA in our study, in the Finnish, Czech, and Portuguese studies, whereas they were selected from healthy, unrelated individuals in the

other populations (Juvonen *et al*, 2005; Bauer *et al*, 2005b; Silveira *et al*, 2002; Takano *et al*, 1998; Basu *et al*, 2000). Statistical analyses of differences in the frequency of SCA diseases between Brazilian and the other population groups were performed with the Fisher exact test (Table 2). We employed Brazilian SCAs frequencies published previously by Trott *et al*. (2006) to carry out these comparisons.

Table 1

Table 2

Discussion

We present here data generated from a protocol applying an efficient semi-automated protocol, combining multiplex PCR using fluorescent primers and capillary electrophoresis, for quantifying CAG repeats length in genes associated with SCA1, SCA2, SCA3, and SCA6. The quantitative analysis is more precise than qualitative analysis to SCA diagnosis and is recommended for routine examination, especially for detecting intermediate fragments. This protocol is not expected to detect very large CAG expansions, as it can occur in infantile/juvenile onset SCA2. In these cases, Southern blotting analysis is indicated for being a more reliable method to detect extremely large expansions.

Other two similar methods using fluorescent primers to diagnosis of spinocerebellar ataxias were published previously. The first published study applied chimeric primers in order to obtain primers of similar melting temperatures as an approach for successful multiplex amplification of SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, and SCA7 genes (Dorschner *et al*, 2002). This strategy, however, needs a complex procedure involving the use of bacterial phage M13-based sitedirected mutagenesis, oligonucleotide primers and linkers and exonucleases, followed by plasmid propagation in *E. coli*. These processes required careful design of target constructs, and involved a laborious procedure. We would like to point out that the protocol used in this work dismisses the need of adjusting primers melting temperatures (e.g., by changing their lengths), being more flexible and straightforward to be introduced in a routine laboratory.

In the other protocol, multiplex PCR was also applied and fragments were resolved through electrophoresis using 6% denaturing polyacrylamide gel (PAGE), in a genetic

analyzer for detecting fluorescent fragments of SCA1, SCA2, SCA3, and SCA7 genes (Bauer *et al.*, 2005a). We then decided to apply capillary electrophoresis due to a number of advantages of this method when comparing to PAGE. Capillaries are better in dissipating energy generated in the electrophoresis procedure, increasing separation overall resolution. Use of capillaries also reduces cross contamination due to constant replacement of liquid polymer at each run. In addition, the use of capillaries also allows application of much higher electrical fields making the separations faster.

In trinucleotide-repeat disorders, an underestimation of amplicon size could result in a misdiagnosis, particularly for alleles that are near the threshold of the normal, intermediate, or abnormal size ranges. Routine clinical use of capillary electrophoresis for diagnosis of at least some trinucleotide repeat disorders requires a method that corrects size discrepancy due to different mobility of fragments. In the method published previously by Dorschner *et al.* (2002), the degree of anomalous migration was different at each locus and a specific correction formula was applied to each SCA. In our protocol, this underestimation was constant, and a correct size determination was thus possible making an addition of 6 bp to adjust fragment sizes.

The incidence of particular subtypes differs in various populations. As an association between SCA prevalence and frequency of large normal CAG repeat sizes has been found in Japanese and Caucasian populations, the authors speculated that this fact may contribute to produce mutant alleles in SCAs of dominant inheritance (Takano *et al.*, 1998).

At SCA1 locus, considering 248 chromosomes in the studied population, large normal alleles higher than 31 repeats represent 18% in our population, while alleles higher than 32 repeats represent 5%, frequencies significantly higher than Japanese population

(4%, $P < 0.001$ and 1%, $P = 0.024$, respectively). However, SCA1 frequency in Brazil reported up to date is lower than in Japan (0.9% vs 3%-25%, depending on Japanese geographical regions). When large normal alleles of more than 33 (3%) repeats is compared to other groups, our sample frequency is lower than among Finns (7%, $P = 0.019$) and Portuguese (11%, $P = 0.001$). Similar comparison showed that frequency of large normal alleles higher than 34 (2%) is also lower in our sample population than in Finns (6%, $P = 0.007$). This data implies that SCA1 would be more frequent in the latter group, although there is no significant difference in SCA1 frequency at these two groups. In addition, there is no difference between Brazilian and Portuguese SCA1 frequency.

At SCA2 locus, considering alleles higher than 22 repeats to represent large normal alleles, frequency of large normal alleles is estimated to be 11% in the studied population. Further, comparing data from this study with those on Finns, Indian, Japanese, and Portuguese, pairwise chi-square test indicated that frequency of large normal alleles with more than 22 triplets is significantly higher in our group than in the Indian and Japanese population (4%, $P = 0.001$, and 1%, $P < 0.001$, respectively). This observation is consistent with finding that Indians are genetically between Caucasoids and Mongoloids (Majumder, 1998). However, prevalence of SCA2 in the Indian population appears to be the highest among the SCA subtypes and is even higher than that among whites. Frequency of SCA2 in India is significantly higher than in Brazil ($P = 0.006$), although high frequency of large normal alleles among Indian normal chromosomes was not observed in comparison with our Brazilian group. SCA2 alleles of >22 repeats have already been reported to be less frequent in Indian population when compared with Caucasians ($P = 0.009$), despite that SCA2 is much more frequent in India (Saleem *et al*, 2000). The reasons for differences in SCA2 prevalence in Indians from other geographic areas are not clear, and might be

explained by a founder effect (Sinha *et al*, 2004). In addition, frequency of SCA2 in Japan (5%) is similar to Brazil (4.4%), in spite of the fact that higher frequency of large normal alleles was shown in our sample population.

At SCA3 locus, large normal alleles (>27 and >28 repeats) made up 24% (50/209) and 11% (23/209), respectively. These frequencies in the studied Brazilian population are significantly higher than in Finns, Czech and Portuguese populations. There was no statistically significant difference with the Indian and Japanese population. Statistical analysis indicated that Brazilians differ from other groups for the SCA3 frequency. So far, among the European populations from which SCA testing results have been reported, no cases of SCA3 patients in Finland, Poland and Czech Republic have been published (Juvonen *et al*, 2005; Bauer *et al*, 2005b). Bauer *et al*. (2005b) postulated that lack of SCA3 in the Czech population might be explained by the absence of large normal alleles and consequently a relatively small reservoir for aberrant CAG expansions at the SCA3 locus. In Brazil, expansion at SCA3 locus is significantly higher than in Portugal (53%, $P<0.001$).

At SCA6 locus, frequency of large normal alleles (>13 repeats) is 4% in our sample population. As previously carried out for SCA1, SCA2, and SCA3 loci, we compared our data on large normal alleles (>13 repeats) with those from other populations that was significantly lower in our sample population than in Japanese population (20%, $P<0.001$). No significant difference was observed with other populations. This observation is consistent with a higher incidence of SCA6 among Japanese SCA patients than among Brazilian SCA patients (11% vs 1.8%, $P=0.002$). Regional differences are reported in Japan, where the SCA6 frequency ranges from 6% to 31% (Matsuyama *et al*, 1997; Watanabe *et al*, 1998).

The reasons of differences in size distributions of normal alleles and frequencies of large normal alleles among populations remain unknown. These differences may simply represent founder effects. However, the distributions of the CAG repeat sizes are likely to be in a dynamic state depending on CAG repeats mutation frequencies of corresponding genes. Frequency of SCA3 and SCA6 large normal alleles in this study reflects the prevalence of these two diseases in our population, supporting the hypothesis that disease alleles can arise from expansion of large normal alleles. We believe that data generated here brings new insight to this field and that future investigations will elucidate and clarify the role of larger normal alleles in the etiology of SCAs.

Moreover, this study provides the first detailed analysis, to our knowledge, of the distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2, SCA3, and SCA6 loci by multiplex-PCR and automated capillary electrophoresis in Brazilian patients. Application of the protocol presented here will speed up automated genotyping for routine molecular diagnostics as well as large-scale genetic studies.

Acknowledgements

We would like to thank patients and their families for providing biological material for this study. We would also thank Thais Stanoski Santa Rita, Hugo Bock and Rodrigo Rodenbusch for their help with this work. This research was supported by Brazilian Funding Agencies (CNPq and FINEP/HCPA).

References

- Abramson JH (2004) WINPEPI (PEPI-for-Windows) computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, 2004, 1:6 (available on the Internet at www.epi-perspectives.com/content/1/1/6).
- Basu P, Chattopadhyay B, Gangopadhaya PK, Mukherjee SC, Sinha KK, Das SK, Roychoudhury S, Majumder PP, Bhattacharyya NP (2000) Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. *Hum Genet* 106:597-604.
- Bauer PO, Kotliarova SE, Matoska V, Musova Z, Hedvicakova P, Boday A, Tomek A, Nukina N, Goetz P (2005a) Fluorescent Multiplex PCR: Fast Method for Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxias Screening. *Russian J Genet* 41:675-682 From *Genetika* 2005, 41:830-837.
- Bauer PO, Zumrova A, Matoska V, Marikova T, Krilova S, Boday A, Singh B, Goetz P (2005b) Absence of spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease within ataxic patients in the Czech population. *Eur J Neurol* 12:851-857.
- Bird TD. Ataxia overview. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle, last revision 27/10/06, www.geneclinics.org/profiles/ataxias.
- Costa Lima MA and Pimentel MMG (2004) Dynamic mutation and human disorders: The spinocerebellar ataxias. *Intern J Mol Med* 13:299-302.
- Dorschner MO, Barden D, Stephens K (2002) Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn* 4:108-113.
- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001a) Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)_n. *Arch Neurol* 58:899-904.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, do Ceu Moreira M, Mendonca P, Ferreirinha F, Sequeiros J, Giugliani R (2001b) A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 248:870-876.
- Juvonen V, Hietala M, Kairisto V, Savontaus ML (2005) The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population. *Acta Neurol Scand* 111:154-162.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, *et al* (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221-227.
- Larsen LA, Gronskov K, Norgaard-Pedersen B, Brondum-Nielsen K, Hasholt L, Vuust J (1997) High-throughput analysis of fragile X (CGG)_n alleles in the normal and premutation range by PCR amplification and automated capillary electrophoresis. *Hum Genet* 100:564-568.
- Majumder PP (1998) People of India: biological diversity and affinities. *Evol Anthropol* 6:100-110.
- Matsuyama Z, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Komure O, Udaka F, Kameyama M, Nishio T, Kuroda Y, Nishimura M, Nakamura S (1997) Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum Mol Genet* 6:1283-1287.

- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF (1998) A simple salting-out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Orr H, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY (1993) Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4:221-226.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14:269-276.
- Saleem Q, Choudhry S, Mukerji M, Bashyam L, Padma MV, Chakravarthy A, Maheshwari MC, Jain S, Brahmachari SK (2000) Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: high frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation. *Hum Genet* 106:179-187.
- Schelhaas HJ, Ippel PF, Beemer FA, Hageman G (2000) Similarities and differences in the phenotype, genotype, and pathogenesis of different spinocerebellar ataxias. *Eur J Neurol* 7:309-314.
- Schols L, Amoiridis G, Buttner T, Przuntek H, Epplen JT, Riess O (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 42:924-932.
- Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Junior W, Maciel JA, Jerin S, Sack G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg R, MacLeod P, Chitayat D, Babul R, Sequeiros J, Rouleau GA (1996) Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology* 46:214-218.
- Silveira I, Miranda C, Guimarães L, Moreira MC, Alonso I, Mendonca P, Ferro A, Pinto-Basto J, Coelho J, Ferreirinha F, Poirier J, Parreira E, Vale J, Januario C, Barbot C, Tuna A, Barros J, Koide R, Tsuji S, Holmes SE, Margolis RL, Jardim L, Pandolfo M, Coutinho P, Sequeiros J (2002) Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG) n allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol* 59:623-629.
- Takano H, Cancel G, Ikeuchi T, Lorenzetti D, Mawad R, Stevanin G, Didierjean O, Durr A, Oyake M, Shimohata T, Sasaki R, Koide R, Igarashi S, Hayashi S, Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Zoghbi H, Brice A, Tsuji S (1998) Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 63:1060-1066.
- Trott A, Jardim LB, Ludwig HT, Saute JA, Artigas O, Kieling C, Wanderley HY, Rieder CR, Monte TL, Socal M, Alonso I, Ferro A, Carvalho T, do Ceu Moreira M, Mendonca P, Ferreirinha F, Silveira I, Sequeiros J, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML (2006) Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet* 70:173-176.
- Watanabe H, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Ando T, Mitsuma T, Sobue G (1998) Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Clin Genet* 53:13-19.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15:62-69.

Figure Legends

Figure 1 – Distribution of normal alleles at SCA loci. A) SCA1 locus; B) SCA2 locus; C) SCA3 locus; D) SCA6 locus.

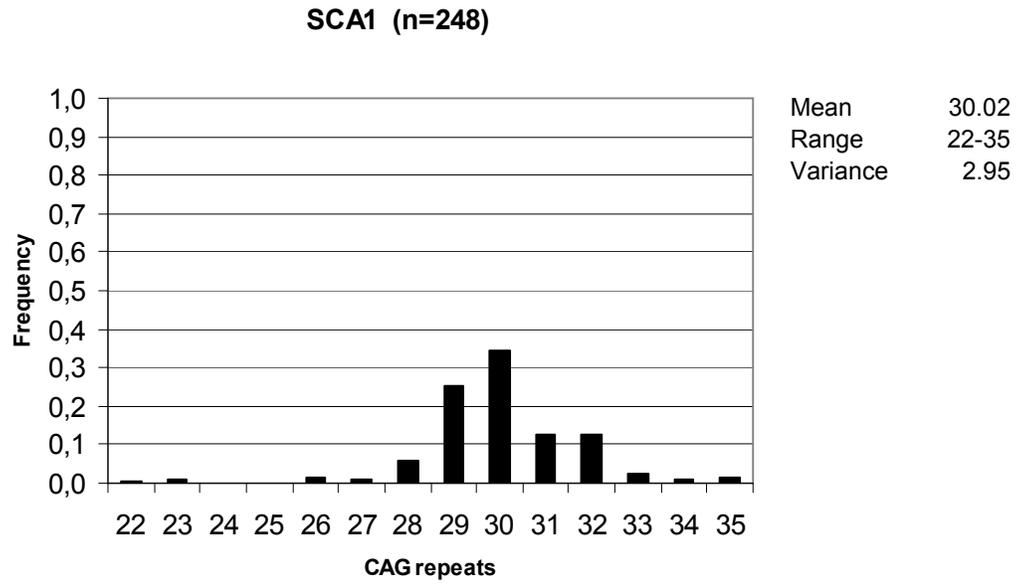
Table Legends

Table 1 – Comparison of large normal allele frequencies at SCA loci in our sample and previously published studies.

Table 2 – SCA frequencies in different studies.

FIGURE 1

A



B

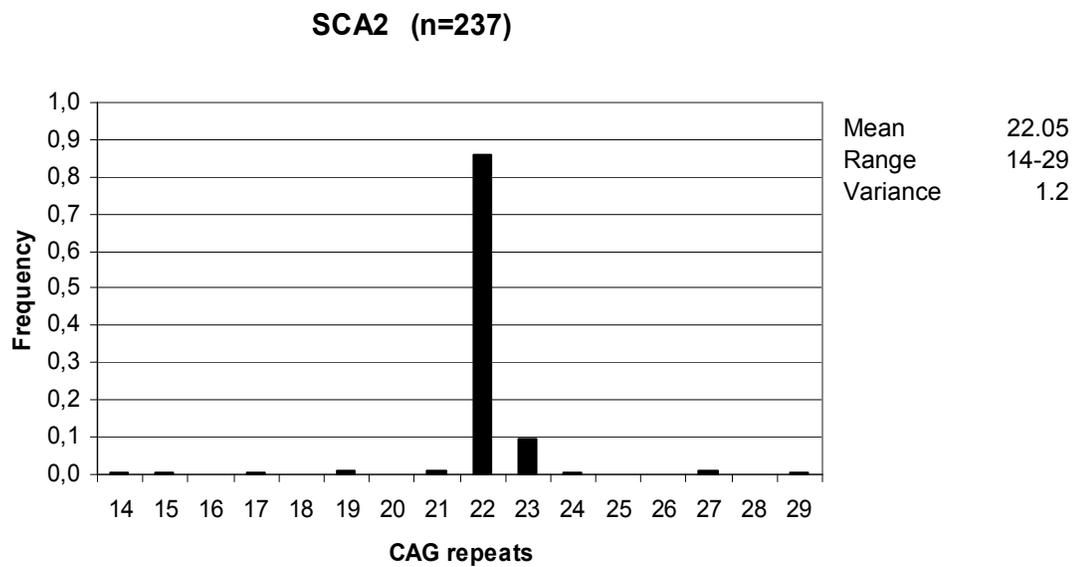
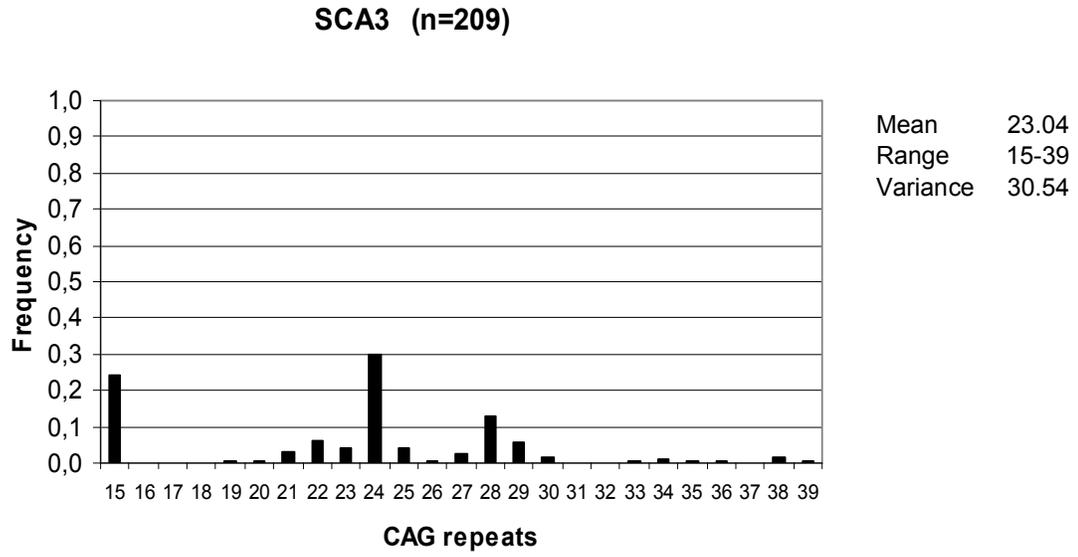


FIGURE 1 (cont.)

C



D

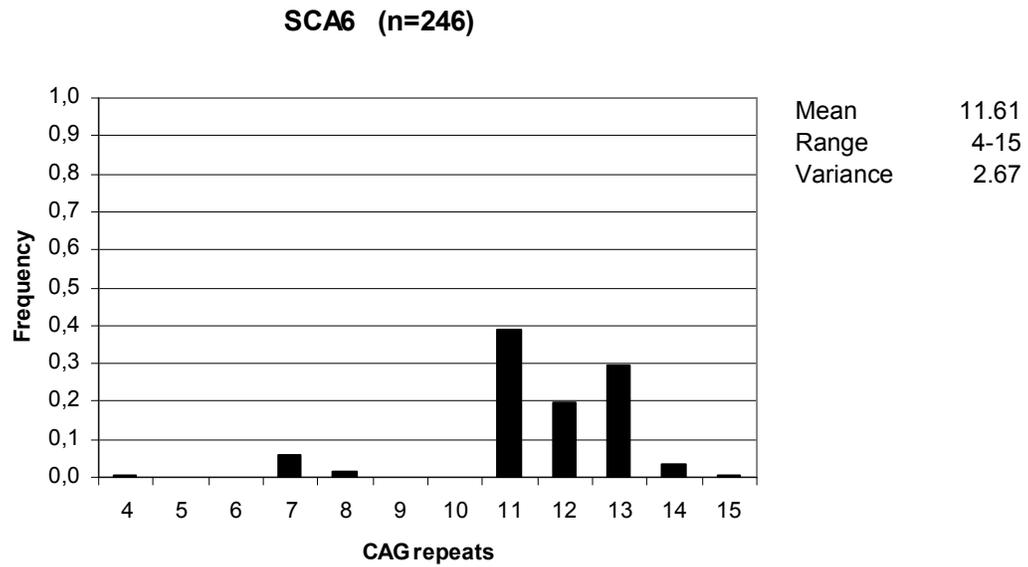


TABLE 1

Locus	Repeats	Current study	Finnish ¹	Indian ²	Czech ³	Japanese ⁴	Portuguese ⁵
SCA1	>31	0.18	0.22 (<i>P</i> =0.208)	0.21 (<i>P</i> =0.354)		0.04 (<i>P</i> <0.001)*	
	>32	0.05	0.12 (<i>P</i> =0.003)*			0.01 (<i>P</i> =0.024)*	
	>33	0.03	0.07 (<i>P</i> =0.019)*				0.11 (<i>P</i> =0.001)*
	>34	0.02	0.06 (<i>P</i> =0.007)*				0.02 (<i>P</i> =0.868)
SCA2	>22	0.11	0.07 (<i>P</i> =0.091)	0.04 (<i>P</i> =0.001)*		0.01 (<i>P</i> <0.001)*	0.13 (<i>P</i> =0.588)
	>23	0.02	0.04 (<i>P</i> =0.099)			0.01 (<i>P</i> =0.552)	0.04 (<i>P</i> =0.171)
SCA3	>27	0.24	0.10 (<i>P</i> <0.001)*	0.17 (<i>P</i> =0.163)	0.09 (<i>P</i> <0.001)*	0.21 (<i>P</i> =0.451)	0.07 (<i>P</i> <0.001)*
	>28	0.11	0.02 (<i>P</i> <0.001)*		0.04 (<i>P</i> =0.004)*	0.11 (<i>P</i> =0.842)	0.02 (<i>P</i> <0.001)*
SCA6	>13	0.04	0.02 (<i>P</i> =0.160)	0.03 (<i>P</i> =0.560)		0.20 (<i>P</i> <0.001)*	0.02 (<i>P</i> =0.380)

P-values were obtained from chi-square analysis comparing data from this study to previously reported data. * denotes statistically significant. ¹Juvonen *et al.* (2005), ²Basu *et al.* (2000), ³Bauer *et al.* (2005b), ⁴Takano *et al.* (1998), ⁵Silveira *et al.* (2002).

TABLE 2

Locus	Brazilian ¹	Finnish ²	Indian ³	Czech ⁴	Japanese ⁵	Portuguese ⁶
SCA1	0.9	0.8 (<i>P</i> =0.676)	10.5 (<i>P</i> =0.006)*	1.7	3.0 (<i>P</i> =0.213)	NF (<i>P</i> =0.440)
SCA2	4.4	0.4 (<i>P</i> =0.013)*	17.5 (<i>P</i> =0.006)*	11.0	5.0 (<i>P</i> =0.529)	4.8 (<i>P</i> =0.556)
SCA3	84.2	NF (<i>P</i> <0.001)*	7.0 (<i>P</i> <0.001)*	NF (<i>P</i> <0.001)*	43.0 (<i>P</i> <0.001)*	53.1 (<i>P</i> <0.001)*
SCA6	1.8	0.4 (<i>P</i> =0.231)	1.8 (<i>P</i> =0.706)	NF	10.9 (<i>P</i> =0.002)*	NF (<i>P</i> =0.193)

P-values were obtained from Fisher exact test comparing frequencies of SCA diseases between Brazilian and other population groups * denotes statistically significant. NF means not found. ¹Trott *et al.* (2006), ²Juvonen *et al.* (2005), ³Basu *et al.* (2000), ⁴Bauer *et al.* (2005b), ⁵Takano *et al.* (1998), ⁶Silveira *et al.* (2002).

4. DISCUSSÃO

4.1. Validação da metodologia de PCR multiplex e eletroforese capilar para análise quantitativa de repetições CAG nos *loci* SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6

Neste trabalho, apresentamos um protocolo laboratorial rápido e eficiente, utilizando PCR multiplex e eletroforese capilar (EC), para a análise de repetições CAG em quatro genes associados a SCAs (SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6). O desenvolvimento de um PCR multiplex é sempre um desafio devido ao fato que é essencial a amplificação de quantidades equivalentes de cada produto, que pode ser dificultado pela variação do anelamento dos *primers* à seqüência alvo no momento da reação. Neste estudo, utilizamos uma estratégia *touchdown* para contornar os problemas com temperaturas de anelamento específicas para cada par de *primer* escolhido. Os experimentos para padronização do teste foram realizados em uma amostra normal e em uma amostra positiva para cada uma das SCAs, cujos tamanhos dos alelos normais e dos alelos expandidos foram previamente determinados para cada *locus*. A otimização do PCR multiplex precisou do ajuste das concentrações de *primers* até que as amplitudes dos picos de cada fragmento ficassem relativamente próximas. As concentrações dos *primers* foram ajustadas em 15 pmol cada um dos *primers* Rep1 e Rep2 e em 20 pmol cada um dos *primers* MJD52 e MJD25 por reação para aumentar as amplitudes dos fragmentos. Para melhorar a eficiência da amplificação, utilizamos uma solução de DMSO 10% (v/v) que possui a característica de facilitar a separação das fitas de DNA em estruturas ricas em GC (Musso *et al*, 2006).

Dois métodos semelhantes utilizando PCR multiplex com *primers* fluorescentes para identificação de SCAs foram publicados previamente. O primeiro estudo publicado usou *primers* quiméricos para obtenção de temperaturas de anelamento semelhantes como uma estratégia para amplificação simultânea dos genes SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 e SCA7 (Dorschner *et al*, 2002). Entretanto, esta estratégia requer a realização um processo trabalhoso de clonagem dos fragmentos em bactérias.

No outro protocolo, PCR multiplex foi também utilizado e os fragmentos produzidos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% (PAGE), em analisador genético para detecção dos fragmentos fluorescentes dos genes SCA1, SCA2, SCA3 e SCA7 (Bauer *et al.*, 2005a). No nosso trabalho, decidimos utilizar eletroforese capilar devido às vantagens apresentadas por esse método. Capilares dissipam a energia gerada pelo procedimento de eletroforese, aumentando a resolução da separação dos fragmentos. O uso de capilares também reduz a contaminação cruzada devido a troca de polímero em cada corrida. Além disso, o uso de capilares também permite a aplicação de campos elétricos mais altos, consequentemente aumentando a velocidade da separação.

A marcação dos *primers* com fluorescência apresenta grande versatilidade. O uso de fluorescência também permite a determinação dos tamanhos dos fragmentos com acurácia pela comparação com fragmentos marcados de tamanhos conhecidos. Porém, em pacientes SCA2 com expansões extremamente longas (casos juvenis), este método não é indicado. Nesse caso, análise por *Southern blotting* é indicada por ser um método mais confiável para detectar expansões muito grandes (Mao *et al.*, 2002).

Devido a grande sobreposição de características clínicas para SCAs e, assim, tornando problemático o diagnóstico diferencial, incluindo DRPLA e FRDA, a triagem de vários genes parece ser essencial. O PCR multiplex-EC reduz o tempo de análise comparado aos métodos tradicionais, nos quais todos os genes devem ser amplificados separadamente. Os custos também podem ser reduzidos, já que menores quantidades de reagentes são utilizadas. Outra vantagem é a possibilidade de evitar a utilização de nucleotídeos marcados radioativamente no produto de PCR. Este método também permite a eliminação do brometo de etídeo, um agente mutagênico que possibilita a visualização, através de luz ultravioleta, dos fragmentos de DNA após a eletroforese em gel de agarose. O método é versátil, podendo ser adaptado para outros tipos de SCAs de acordo com a prevalência em diferentes populações.

EC necessita de alguns ajustes devido à diferença de mobilidade dos fragmentos. Análises de amplicons marcados com fluorescência para doenças de repetições trinucleotídicas como doença de Huntington (CAG)_n e síndrome do X-frágil (CGG)_n resultaram em uma migração mais rápida e subsequente subestimação do tamanho (Larsen *et al.*, 1997; Le *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1999; Rosenblum *et al.*, 1997). Migração rápida

de amplicons de SCA, DH e FMR1 comparada aos padrões internos pode ser atribuída a diferenças significantes na composição de bases (com repetições *versus* sem repetições), particularmente seqüências ricas em GC (Williams *et al*, 1999). Outros fatores que contribuem para discrepâncias no tamanho podem ser a temperatura da eletroforese, o tipo de polímero, efeito eletroosmótico e a extensão de desnaturação (Le *et al*, 1997; Williams *et al*, 1999; Roseblum *et al*, 1997).

Em doenças de repetições trinucleotídicas, uma subestimação do tamanho do amplicon poderia resultar em um falso diagnóstico, principalmente para alelos expandidos que estão próximos ao limiar de normalidade. O uso de EC na rotina clínica para diagnóstico requer um método que corrija esta discrepância no tamanho. Neste trabalho, observamos que a subestimação se manteve constante em todas as análises e uma determinação correta do tamanho foi possível somando-se 6 pb a todos os fragmentos. No método publicado previamente por Dorschner *et al*. (2002), o grau de migração anômala foi diferente para cada *locus*. Amplicons com muitas repetições migraram mais rapidamente, fato mais pronunciado para SCA1 e SCA7. Os autores utilizaram uma fórmula de correção específica para cada *locus*, para facilitar a correção do tamanho do amplicon e minimizar os erros de cálculo.

Este teste passou a ser usado na rotina laboratorial para diagnóstico de pacientes com sinais e/ou sintomas de ataxia. O multiplex semi-automatizado melhora a eficiência do teste e o tempo de análise, facilitando assim o diagnóstico de SCAs na prática clínica. Além disso, como possui a vantagem de determinar exatamente o número de repetições, poderá ser aplicado a pesquisas que buscam relacionar o número de repetições com idade de início e manifestações clínicas.

4.2. Distribuição dos alelos normais na população analisada

A distribuição do polimorfismo no *locus* SCA1 observado em nossa amostra é similar ao encontrado em estudos realizados na Finlândia, nos quais os alelos SCA1 normais variam de 22 a 36 repetições trinucleotídicas (Juvonen *et al*, 2005), e na Índia, onde os alelos variam de 23 a 36 repetições CAG (Basu *et al*, 2000). Essa distribuição é diferente da observada na Espanha, na qual a faixa de variação é bastante ampla (6 a 40

repetições CAG) (Pujana *et al*, 1999). Indivíduos heterozigotos representam 77% do total da amostra, nível intermediário aos observados nos EUA (80%) e na Espanha (72%) (Ranum *et al*, 1994; Pujana *et al*, 1999). O alelo mais freqüente em nossa amostra apresenta 30 repetições CAG; esse mesmo alelo foi também observado como o mais freqüente em uma amostra da população de Formosa (Tsai *et al*, 2004). Os nossos dados são diferentes dos encontrados em uma amostra de portugueses (alelo mais freqüente = 31 repetições) e uma amostra de brasileiros (alelo mais freqüente = 32 repetições) (Silveira *et al*, 2002), bem como para as populações norte-americanas e indianas, com 29 repetições (Chung *et al*, 1993; Ranum *et al*, 1994; Saleem *et al*, 2000; Basu *et al*, 2000). Na Espanha, o alelo com 31 repetições é o mais frequente (Pujana *et al*, 1999). O padrão de distribuição alélica de SCA1 encontrado na nossa amostra brasileira é similar ao padrão publicado em um estudo realizado na Finlândia, na qual 90% dos alelos apresentam de 28 a 33 repetições (Juvonen *et al*, 2005).

A análise molecular do *locus* SCA2 revelou 10 alelos diferentes, variando de 14 a 29 repetições CAG. Esta variação foi similar à apresentada por outras populações (Tsai *et al*, 2004; Basu *et al*, 2000; Juvonen *et al*, 2005). O alelo mais freqüente da nossa amostra apresenta 22 repetições e representa 86% dos alelos analisados. A alta freqüência deste alelo também foi relatada em amostras da França e do Japão (Sanpei *et al*, 1996; Imbert *et al*, 1996). A grande maioria dos alelos na nossa amostra (95%) apresenta de 21 a 23 repetições. Este fato também foi observado no EUA e no Japão (Takano *et al*, 1998; Geschwind *et al*, 1997). Portanto, neste trabalho, encontramos um padrão de distribuição similar ao encontrado em outras populações.

No *locus* SCA3, os alelos variaram de 15 a 39 repetições. Esta variação nos tamanhos dos alelos normais está de acordo com estudos de outras populações e também com outros estudos de famílias brasileiras publicados previamente (Maciel *et al*, 1995; Lopes-Cendes *et al*, 1997; Jardim *et al*, 2001b; Trott *et al*, 2006). Por outro lado, enquanto um alto nível de heterozigosidade foi descrito em Formosa (93%) (Tsai *et al*, 2004), o nosso trabalho demonstrou um nível de 75%. Os dois alelos mais freqüentes na nossa amostra apresentam 15 e 24 repetições CAG, diferentemente de outros estudos nos quais os alelos mais freqüentes foram os de 14 e 23 repetições (Silveira *et al*, 2002; Juvonen *et al*, 2005; Takano *et al*, 1998; Bauer *et al*, 2005b; Storey *et al*, 2000). Em Formosa, o alelo de 16 repetições apresentou a maior freqüência (Tsai *et al*, 2004). Duas amostras foram

seqüenciadas para verificar se o número de repetições inferido pelo PCR multiplex-EC estava correto e os tamanhos foram confirmados.

A variação do número de repetições CAG no *locus* SCA6 em nossa amostra foi a mesma encontrada em um estudo realizado na Finlândia (Juvonen *et al*, 2005). Essa variação também foi semelhante a um estudo realizado em Formosa, nos quais os alelos SCA6 normais variaram de 6 a 16 repetições trinucleotídicas (Tsai *et al*, 2004) e semelhante a um estudo de outros caucasianos, que variaram de 4 a 14 repetições (Takano *et al*, 1998). Observamos uma diferença em relação à variação encontrada no Japão (5 a 19 repetições CAG) (Takano *et al*, 1998). A nossa amostra demonstrou um nível de heteroziguidade de 69%, o qual é semelhante ao nível descrito na Índia (71%) (Basu *et al*, 2000) e muito menor ao descrito em Formosa (94%) (Tsai *et al*, 2004). O alelo mais freqüente apresenta 11 repetições CAG, sendo o mesmo encontrado na população indiana (Basu *et al*, 2000) e em um outro estudo analisando indivíduos portugueses e brasileiros (Silveira *et al*, 2002).

4.3. Freqüências dos alelos normais grandes *versus* freqüências relativas das SCAs

O mecanismo proposto para as mutações dinâmicas envolve a expansão de uma seqüência de nucleotídeos em sucessivas gerações até alcançar um tamanho patológico que é específico para cada doença. A repetição mutada é instável nas células somáticas e germinativas e as expansões ocorrem mais freqüentemente que as retrações (Warren, 1996; Timchenko & Caskey, 1997; Cummings & Zoghbi, 2000). Estudos baseados em diversas famílias encontraram que o número de repetições CAG aumenta numa média de 0,86 a 1,60 entre cada sucessiva geração (Tan *et al*, 2000; Soong *et al*, 1997; Mori *et al*, 2001). Este efeito pode ser mais proeminente na transmissão paterna (Soong *et al*, 1997).

Os caminhos que levam à expansão vêm sendo estudados intensivamente, mas ainda não são bem compreendidos. Os eventos que levam a conversão de repetições normais grandes na sua versão expandida são de interesse particular (Mirkin, 2006).

Estudos anteriores enfatizam as prevalências diferentes de várias SCAs por todo o mundo. As razões para estas diferenças são desconhecidas, mas as variações nas

freqüências observadas estão provavelmente relacionadas a um efeito fundador. Takano e colaboradores (1998) mostraram que as diferenças nas prevalências de SCAs e DRPLA em populações caucasianas e japonesas estavam relacionadas às freqüências de alelos normais grandes dos respectivos genes. Mittal e colaboradores (2005) identificaram um haplótipo comum ACA em 9 famílias indianas com MJD. Este haplótipo também estava associado com alelos normais grandes (maiores que 26 repetições) em indivíduos indianos não afetados. Os autores sugeriram que os alelos patogênicos expandidos podem ter se originado de alelos normais grandes presentes na população, possivelmente através de um evento de conversão gênica. Os achados foram consistentes com evidências históricas de ligação marítima entre Portugal e o sul da Ásia.

No *locus* SCA1, alelos normais grandes (ANGs) maiores que 31 e maiores que 32 repetições constituíram 18% (44/248) e 5% (13/248), respectivamente. No estudo realizado por Takano *et al.* (1998), estas freqüências foram 4% e 1% entre os japoneses e 16% e 4% entre os caucasianos, respectivamente. Esta observação está correlacionada com a prevalência mais alta de SCA1 em famílias caucasianas (15%) que em famílias japonesas (3%). A freqüência de ANGs (com mais de 31 e 32 repetições) na população brasileira é significativamente maior que na população japonesa ($P < 0,001$ para 31 repetições e $P = 0,024$ para 32 repetições). Entretanto, a freqüência de SCA1 no Brasil é menor do que no Japão (0,9% vs 3%-25%, dependendo da região geográfica do Japão). Quando comparamos as freqüências dos ANGs (com mais de 33 repetições – 3% e com mais de 34 repetições – 2%) com outros grupos, as freqüências entre brasileiros são significativamente mais baixas que entre finlandeses (7%, $P = 0,019$ e 6%, $P = 0,007$, respectivamente), embora não exista diferença estatisticamente significativa na freqüência de SCA1 entre os dois grupos.

No *locus* SCA2, se considerarmos os ANGs com mais de 22 repetições, a freqüência observada na população brasileira é de 11% (26/237). O teste do qui-quadrado, comparando a freqüência no nosso estudo com as freqüências de outros grupos, demonstrou que esta freqüência é significativamente mais alta que em populações indianas e japonesas (4%, $P = 0,001$ e 1%, $P < 0,001$, respectivamente). Esta observação é consistente com os achados que indianos estão geneticamente localizados entre caucasóides e mongolóides (Majumder, 1998). Contudo, a prevalência de SCA2 na população indiana

parece mais alta que outros subtipos de SCAs e é mais alta que entre caucasianos. A frequência de SCA2 na Índia também é significativamente mais alta que no Brasil ($P=0,006$), embora não tenha sido encontrado um excesso de ANGs nos cromossomos da amostra indiana comparada a brasileira. Alelos SCA2 com mais de 22 repetições foram descritos como sendo menos frequentes em indianos quando comparados a caucasianos ($P=0,009$), apesar de SCA2 ser muito mais freqüente na Índia (Saleem *et al*, 2000). A população indiana é etnicamente diversa, mesmo em pequenas regiões geográficas do país. Além disso, muitas mutações permanecem não identificadas em um grande número de pacientes (Sinha *et al*, 2004). As razões para esta diferença de prevalência de SCA2 em populações indianas em relação a populações de outras áreas geográficas não estão claras, mas podem ser atribuídas a um efeito fundador (Sinha *et al*, 2004). Além disso, a frequência de SCA2 no Japão (5%) é semelhante a do Brasil (4,4%), apesar da alta frequência de ANGs observada na nossa população.

No *locus* SCA3, ANGs maiores que 27 e maiores que 28 repetições representaram 24% (51/209) e 11% (24/209), respectivamente. Estas frequências são significativamente maiores que as frequências encontradas em finlandeses, checos e portugueses. Não houve diferença em relação à população indiana e japonesa. A análise estatística dos dados demonstrou que os brasileiros apresentam uma frequência de SCA3 diferente de todas as outras populações. Até o momento, entre as populações européias, a Finlândia, a Polônia e a República Checa (Juvonen *et al*, 2005; Bauer *et al*, 2005b) são os únicos países em que nenhum paciente com SCA3 foi identificado. Bauer *et al*. (2005b) postulou que a ausência de SCA3 na população checa poderia ser explicada pela falta de ANGs e, conseqüentemente, existiria um pequeno reservatório para expansões no *locus* SCA3. A SCA3 é significativamente mais freqüente no Brasil que em Portugal (53%, $P<0,001$).

No *locus* SCA6, a frequência dos ANGs com mais de 13 repetições foi estimada em 4% (10/246) para a nossa amostra brasileira. Assim como nos *loci* SCA1, SCA2 e SCA3, comparamos nossos dados com os dados de outras populações e a frequência estabelecida nesse trabalho foi significativamente menor na nossa amostra quando comparada com a população japonesa (20%, $P<0,001$). Não houve diferença em relação às outras populações. Esta observação está de acordo com a maior incidência de SCA6 entre pacientes japoneses comparada aos pacientes brasileiros (11% vs 1,8%, $P=0,002$).

A causa das diferenças nas distribuições dos tamanhos de alelos normais e nas frequências de ANGs entre populações ainda permanece desconhecida. As diferenças podem simplesmente resultar de um efeito fundador. Entretanto, as distribuições dos números de repetições CAG são, provavelmente, causadas por um estado dinâmico dependente das frequências de mutações nos genes correspondentes. A frequência dos ANGs para SCA3 e SCA6 na nossa amostra reflete a prevalência destas duas doenças na nossa população; estes dados corroboram a hipótese que alelos patogênicos sejam originados pela expansão de ANGs. Acreditamos, portanto, que este estudo possa contribuir para um maior interesse nesta área e que futuras investigações possam elucidar o papel de ANGs na etiologia das SCAs.

4.4. Transferência da tecnologia PCR multiplex-EC para a rotina laboratorial

O protocolo laboratorial estabelecido já está sendo utilizado rotineiramente para a avaliação e diagnóstico de novos casos familiares e casos isolados de um tipo de SCA. Esse novo protocolo já permitiu o diagnóstico de 51 casos novos de SCA, os quais foram avaliados nos últimos 10 meses. Essa metodologia propiciou a introdução da análise quantitativa precisa do número de repetições CAG nos *loci* testados, além da metodologia semi-quantitativa utilizada anteriormente no laboratório. Além disso, essa metodologia acrescenta a possibilidade da realização de estudos familiares, comparando o número de repetições CAG entre os membros da mesma família, podendo contribuir para a melhor compreensão da fisiopatologia dessas doenças.

4.5. Considerações finais

O protocolo laboratorial estabelecido, utilizando PCR multiplex e eletroforese capilar, permitiu a identificação de novos diagnósticos de SCAs e possibilitou ainda uma análise detalhada da distribuição de repetições CAG nos *loci* SCA1, SCA2, SCA3 e SCA6 em indivíduos brasileiros. Esse protocolo proporcionará ainda estudos genéticos de grande escala.

Além disso, a metodologia desenvolvida pode ser adaptada podendo ser aplicada para o diagnóstico de outras SCAs e de outras doenças causadas por repetições nucleotídicas. Esse protocolo poderá trazer benefícios para famílias que apresentam casos familiares de doenças neurodegenerativas.

Concluindo, o trabalho desenvolvido trouxe uma importante contribuição no estabelecimento de diagnósticos precisos e por fazer uma abordagem rápida e ampliada de avaliação de 4 diferentes *loci*, os quais são os responsáveis pela maioria dos casos de SCAs na nossa região.

5. REFERÊNCIAS

- American Society of Human Genetics Board of Directors and The American College of Medical Genetics Board of Directors, The Points to consider: ethical, legal, and psychosocial implications of genetic testing in children and adolescents (1995) *Am J Hum Genet* 57: 1233-1241.
- Babovic-Vuksanovic D, Snow K, Patterson MC, and Michels VV (1998) Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) in an infant with extreme CAG repeat expansion. *Am J Med Genet* 79: 383-387.
- Basu P, Chattopadhyay B, Gangopadhaya PK, *et al* (2000) Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. *Hum Genet* 106: 597-604.
- Bauer PO, Kotliarova SE, Matoska V, *et al* (2005a) Fluorescent Multiplex PCR: Fast Method for Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxias Screening. *Russian J Genet* 2005, 41: 675-682. From *Genetika* 2005 41: 830-837.
- Bauer PO, Zumrova A, Matoska V, *et al* (2005b) Absence of spinocerebellar ataxia type 3/Machado–Joseph disease within ataxic patients in the Czech population. *Eur J Neurol* 12: 851-857.
- Benton CS, de Silva R, Rutledge SL, *et al* (1998) Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. *Neurology* 51: 1081-1086.
- Bird TD. Ataxia overview. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle, last revision 27/10/06, www.geneclinics.org/profiles/ataxias.
- Bonifacino JS and Weissman AM (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 19-57.
- Bonini NM (2002) Chaperoning brain degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16407-16411.
- Brock GJR, Anderson NH and Monckton DG (1999) *Cis*-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Hum Mol Genet* 8: 1061-1067.
- Bryer A, Krause A, Bill P *et al* (2003) The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci* 216: 47-54.
- Buhmann C, Bussopulos A and Oechsner M (2003) Dopaminergic response in parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 18: 219-2221.
- Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, *et al* (2006) SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 129: 235-242.
- Cancel G, Durr A, Didierjean O, *et al* (1997) Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families. *Hum Mol Genet* 6: 709-715.
- Chai Y, Koppenhafer SL, Shoemith SJ, *et al* (1999) Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation *in vitro*. *Hum Mol Genet* 8: 673-682.

- Chai Y, Berke SS, Cohen RE, Paulson HL (2004) Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem* 279: 3605-3611.
- Chan HY, Warrick JM, Gray-Board GL, *et al* (2000) Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9: 2811-2820.
- Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL (2003a) Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 72: 839-849.
- Chen DH, Cimino PJ, Ranum L, *et al* (2003b) Prevalence of SCA 14 and spectrum of PKC γ mutations in a large panel of ataxia patients. *Am J Hum Genet* 73: 546.
- Chen HK, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, *et al* (2003c) Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* 113: 457-468.
- Chung MY, Ranum LP, Duvick LA, Servadio A, Zoghbi HY, Orr HT (1993) Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 5: 254-258.
- Chung MY, Lu YC, Cheng NC, Soong BW (2003) A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23. *Brain* 126:1293-1299.
- Clark HB and Orr HT (2000) Spinocerebellar ataxia type 1- modeling the pathogenesis of a polyglutamine neurodegenerative disorder in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 265-270.
- Costa Lima MA and Pimentel MMG (2004) Dynamic mutation and human disorders: The spinocerebellar ataxias. *Intern J Mol Med* 13: 299-302.
- Coutinho P, Guimnase A, Scaravilli F (1982) The pathology of Machado-Joseph Disease: report of a possible homozygous case. *Acta Neuropathologica* 58: 48-54.
- Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, *et al* (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 19: 148-154.
- Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, *et al* (1999) Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 24: 879-892.
- Cummings CJ and Zoghbi HY (2000) Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genom Hum Genet* 1: 281-328.
- Cummings CJ, Sun Y, Opal P, *et al* (2001) Overexpression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* 10: 1511-1518.
- David G, Abbas N, Stevanin G, *et al* (1997) Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 17: 65-70.
- Davies SW, Beardsall K, Turmaine M, *et al* (1998) Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet-repeat disorders with polyglutamine-repeat expansions? *Lancet* 351: 131-133.
- Devos D, Schraen-Maschke S, Vuillaume I, *et al* (2001) Clinical features and genetic analysis of a new form of spinocerebellar ataxia. *Neurol* 56: 234-238.
- Dokmanovic M and Marks PA (2005) Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 96: 293-304.

- Dorschner MO, Barden D, Stephens K (2002) Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn* 4: 108-113.
- Drüsedau M, Dreesen JC, Die-Smulders C, *et al* (2004) Preimplantation genetic diagnosis of spinocerebellar ataxia 3 by (CAG)_n repeat detection *Mol Hum Reprod* 10: 71-75.
- Dueñas AM, Goold R, Giunti P (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129: 1357-1370.
- Filla A, Mariotti C, Caruso G, *et al* (2000) Relative frequencies of CAG expansions in spinocerebellar ataxia and dentatorubropallidolusian atrophy in 116 Italian families. *Eur Neurol* 44: 31-36.
- Flanigan K, Gardner K, Alderson K, *et al* (1996) Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1. *Am J Hum Genet* 59: 392-399.
- Fujigasaki H, Martin J, De Deyn P, *et al* (2001) CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* 124: 1939-1947.
- Fukutake T, Kamitsukasa T, Arai K, *et al* (2002a) A patient homozygous for the *SCA6* gene with retinitis pigmentosa. *Clin Genet* 61: 375-379.
- Fukutake T, Shinotoha H, Nishinoc H, *et al* (2002b) Homozygous Machado-Joseph disease presenting as REM sleep behaviour disorder and prominent psychiatric symptoms. *Eur J Neurol* 9: 97-100.
- Gage FH (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22: 612-613.
- Gardner RJ, Knight MA, Hara K, *et al* (2005) Spinocerebellar ataxia type 15. *Cerebellum* 4: 47-50.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, *et al* (2001) Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet* 68: 523-528.
- Gazulla J, Errea JM, Benavente I, Tordesillas CJ (2004) Treatment of ataxia in cortical cerebellar atrophy with the GABAergic drug gabapentin. A preliminary study. *Eur Neurol* 52: 7-11.
- Geschwind DH, Perlman S, Figueroa KP, *et al* (1997a) Spinocerebellar ataxia type 6. Frequency of the mutation and genotype-phenotype correlations. *Neurology* 49: 1247-1251.
- Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, *et al* (1997b) The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 60: 842-850.
- Goldberg YP, McMurray C, Zeisler J, *et al* (1995) Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. *Hum Mol Genet* 4:1911-1918.
- Goldmann A, Ramsay, Jenkin T (1996) Ethnicity and myotonic dystrophy: a possible explanation for its absence in sub-Saharan Africa. *Am J Hum Genet* 60: 57-65.
- Gusella JF and MacDonald ME (1996) Trinucleotide instability: A repeating theme in human inherited disorders. *Annu Rev Med* 47: 201-209.
- Harding AE (1983) Classification of hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1:1151-1155.
- Harding AE (1993) Clinical features and classification of the inherited ataxias. *Adv Neurol* 61: 1-14.

- Heiser V, Scherzinger E, Boeddrich A, *et al* (2000) Inhibition of Huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6739-6744.
- Heiser V, Engemann S, Brocker W, *et al* (2002) Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16400-16406.
- Hockly E, Richon VM, Woodman B, *et al* (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2041-2046.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, *et al* (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23: 391-392.
- Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G *et al* (1996) Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Mol Genet* 5: 923-932.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, *et al* (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38: 184-190.
- Ikeuchi T, Takano H, Koide R, *et al* (1997) Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in alpha A voltage dependent calcium channel gene and clinical variations in Japanese population. *Ann Neurol* 42: 879-884.
- Imbert G, Saudou F, Yvert G, *et al* (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 14: 285-291.
- Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, *et al* (1997) Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet* 61: 336-346.
- Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, *et al* (2005) An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and rho Guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 77: 280-296.
- Iwata A, Christianson JC, Bucci M, *et al* (2005) Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13135-13140.
- Jakupciak JP and Wells RD (2000) Gene conversion (recombination) mediates expansions of CTG-CAG repeats. *J Biol Chem* 275: 40003-40013.
- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, *et al* (2001a) Neurologic findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58: 899-904.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, *et al* (2001b) A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 248: 870-876.
- Jessenberger V and Jentsch S (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 112-121.
- Juvonen V, Hietala M, Kairisto V, Savontaus ML (2005) The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population. *Acta Neurol Scand* 111: 154-162.

- Kang S, Ohshima K, Jaworski A and Wells RD (1996) CTG triplet repeats from the Myotonic Dystrophy gene are expanded in *Escherichia coli* distal to the replication origin as a single large event. *J Mol Biol* 258: 543-547.
- Kardasch VHC and Martinez EG (2004) Molecular physiopathology of the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *Rev Invest Clin* 56: 368-374.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, *et al* (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8: 221-227.
- Kennedy L, Evans E, Chen CM, *et al* (2003) Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 12: 3359-3367.
- Khati C, Stevanin G, Durr A, *et al* (1993) Genetic heterogeneity of autosomal dominant cerebellar ataxia type 1: clinical and genetic analysis of 10 French families. *Neurology* 43: 1131-1137.
- Kieran D, Kalmar B, Dick JR, *et al* (2004) Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med* 10: 402-405.
- Klockgether T, Wullner U, Spauschus A, Evert B (2000) The molecular biology of the autosomal-dominant cerebellar ataxias. *Mov Disord* 15: 604-612.
- Knight MA, Gardner RJ, Bahlo M, *et al* (2004) Dominantly inherited ataxia and dysphonia with dentate calcification: spinocerebellar ataxia type 20. *Brain* 127: 1172-1181.
- Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, *et al* (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluyian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 6: 9-13.
- Koob MD, Moseley ML, Shut LJ, *et al* (1999) An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21: 379-384.
- Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 19: 1176-1179.
- Kovtun IV and McMurray CT (2001) Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat Genet* 27: 407-411.
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, *et al* (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* 252: 1711-1714.
- Kunkel TA (1993) Slippery DNA and diseases. *Nature* 365: 207-208.
- Kunst CB and Warren ST (1994) Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 77: 853-861.
- La Spada AR (1997) Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol* 7: 943-963.
- Lang AE, Rogaeva EA, Tsuda T, *et al* (1994) Homozygous inheritance of the Machado-Joseph disease gene. *Ann Neurol* 36: 443-447.
- Larsen LA, Gronskov K, Norgaard-Pedersen B, *et al* (1997) High-throughput analysis of fragile X (CGG)_n alleles in the normal and premutation range by PCR amplification and automated capillary electrophoresis. *Hum Genet* 100: 564-568.
- Lau KK, Lam K, Shiu KL, *et al* (2004) Clinical features of hereditary spinocerebellar ataxia diagnosed by molecular genetic analyses. *Hong Kong Med J* 10: 255-259.
- Le H, Fung D, Trent RJ (1997) Applications of capillary electrophoresis in DNA mutation analysis of genetic disorders. *Mol Pathol* 50: 261-265.
- Lerer I, Merims D, Abeliovich D, *et al* (1996) Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. *European J Human Genet* 4: 3-7.

- Lopes-Cendes I, Teive HGA, Cardoso F *et al* (1997) Molecular characteristics of Machado-Joseph disease mutation in 25 newly described Brazilian families. *Braz J Genet* 20: 717-724.
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JE, *et al* (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57: 54-61.
- Maciel P, Lopes-Cendes I, Kish S, Sequeiros J, Rouleau GA (1997) Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. *Am J Hum Genet* 60: 993-996.
- Majumder PP (1998) People of India: biological diversity and affinities. *Evol Anthropol* 6: 100-110.
- Mantuano E, Veneziano L, Jodice C, Frontali M (2003) Spinocerebellar ataxia type 6 and episodic ataxia type 2: differences and similarities between two allelic disorders. *Cytogenet Genome Res* 100: 147-153.
- Mao R, Aylsworth AS, Potter N, *et al* (2002) Childhood- Onset Ataxia: Testing for Large CAG-Repeats in SCA2 and SCA7. *Am J Med Genet* 110: 338-345.
- Mariotti C, Gellera C, Grisoli M, *et al* (2001) Pathogenic effect of an intermediate-size SCA-6 allele (CAG)₁₉ in a homozygous patient. *Neurology* 57: 1502-1504
- Matilla A, Gorbea C, Einum DD, *et al* (2001) Association of ataxin-7 with the proteasome subunit S4 of the 19S regulatory complex. *Hum Mol Genet* 10: 2821-2831.
- Matsumura R, Futamura N, Fujimoto Y, *et al* (1997) Spinocerebellar ataxia type 6. Molecular and clinical features of 35 Japanese patients including one homozygous for the CAG repeat expansion. *Neurology* 49: 1238-1243.
- Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, *et al* (2000) Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 26: 191-194.
- Matsuura T, Ranum LP, Volpini V (2002) Spinocerebellar ataxia type 10 is rare in populations other than Mexicans. *Neurology* 58: 983-984.
- Matsuyama Z, Kawakami H, Maruyama H, *et al* (1997) Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum Mol Genet* 6: 1283-1287.
- Maurer DJ, O'Callaghan BL and Livingston DM (1996) Orientation dependence of trinucleotide CAG repeat instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 6617-6622.
- McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, *et al* (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9: 2197-2202.
- McC Campbell A, Taye AA, Whitty L, *et al* (2001) Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15179-15184.
- Mirkin, SM (2006) DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Curr Opin Struct Biol* 16: 351-358.
- Mittal U, Srivastava AK, Jain S, Jain S, Mukerji M (2005). Founder haplotype for Machado-Joseph disease in the Indian population. *Arch Neurol* 62: 637-640. Note: Erratum: *Arch Neurol* 62: 1143 only, 2005.
- Miura S, Shibata H, Furuya H, *et al* (2006) The contactin 4 gene locus at 3p26 is a candidate gene of SCA16. *Neurology* 67: 1236-1241.
- Monckton DG, Cayuela ML, Gould FK, *et al* (1999) Very large (CAG)_(n) DNA repeat expansions in the sperm of two spinocerebellar ataxia type 7 males. *Hum Mol Genet* 8: 2473-2478.

- Mor-Cohen R, Magal N, Gadoth N, *et al* (1997) Correlation between the incidence of myotonic dystrophy in different groups in Israel and the number of CTG trinucleotide repeats in the myotonin gene. *Am J Med Genet* 71: 156-159.
- Mori M, Adachi Y, Kusumi M, Nakashima K (2001) A genetic epidemiological study of spinocerebellar ataxias in Tottori prefecture, Japan. *Neuroepidemiology* 20: 144-149.
- Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, *et al* (1998) Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* 51: 1666-1671.
- Mosemiller AK, Dalton JC, Day JW, Ranum LP (2003) Molecular genetics of spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8). *Cytogenet Genome Res* 100: 175-183.
- Mosser DD and Morimoto RI (2004) Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23: 2907-2918.
- Muchowski PJ and Wacker JL (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 6: 11-22.
- Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I (2006) Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagn* 8: 544-550.
- Myers RH, MacDonald ME, Koroshez WJ, *et al* (1993) De novo expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nat Genet* 5: 168-173.
- Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, *et al* (2001) SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10: 1441-1448.
- Nance MA (1997) Clinical aspects of CAG repeat diseases. *Brain Pathol* 7: 881-900.
- Nandagopal R and Moorthy SG (2004) Dramatic levodopa responsiveness of dystonia in a sporadic case of spinocerebellar ataxia type 3. *Postgrad Med J* 80: 363-365.
- Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, *et al* (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252: 1097-1102.
- Ohata T, Yoshida K, Sakai H, *et al* (2006) A -16C>T substitution in the 5' UTR of the puratrophin-1 gene is prevalent in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano. *J Hum Genet* [Epub ahead of print].
- Onodera Y, Aoki M, Tsuda T, *et al* (2000) High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan. *J Neurol Sci* 178: 153-158.
- Orr H, Chung M-Y, Banfi S, *et al* (1993) Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4: 221-226.
- Orr HT and Zoghbi HY (2000) Reversing neurodegeneration: a promise unfolds. *Cell* 101: 1-14.
- Owen BA, Yang Z, Lai M, *et al* (2005) (CAG)_n-hairpin DNA binds to Msh2-Msh3 and changes properties of mismatch recognition. *Nat Struct Mol Biol* 12: 663-670.
- Panigrahi GB, Lau R, Montgomery SE, *et al* (2005) Slipped (CTG)(CAG) repeats can be correctly repaired, escape repair or undergo error-prone repair. *Nat Struct Mol Biol* 12: 654-662.
- Park Y, Hong S, Kim SJ, Kang S (2005) Proteasome function is inhibited by polyglutamine-expanded ataxin-1, the SCA1 gene product. *Mol Cells* 19: 23-30.
- Paulson HL and Fischbeck KH (1996) Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders. *Annu Rev Neurosci* 19: 79-107.
- Paulson HL (1998) Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. In Rubinsztein DC and Hayden MR (eds) *Analysis of Triplet Repeat Disorders*. Bios, Oxford, pp 129-144.

- Paulson HL (2006) RNA interference as potential therapy for neurodegenerative disease. *Neurol* 66: 114-117.
- Pearson CE and Sinden RR (1998) Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 8: 321-330.
- Perutz MF and Windle AH (2001) Cause of neural death in neurodegenerative diseases attributable to expansion of glutamine repeats. *Nature* 412: 143-144.
- Pietrobon D (2002) Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol Neurobiol* 25: 31-50.
- Pujana MA, Corral J, Gratacos M *et al* (1999) Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: genetic analysis of familial and sporadic cases. The Ataxia Study Group. *Hum Genet* 104: 516-522.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, *et al* (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14: 269-276.
- Ragothaman M, Sarangmath N, Chaudhary S, *et al* (2004) Complex phenotypes in an Indian family with homozygous SCA2 mutations. *Ann Neurol* 55: 130-133.
- Ramesar RS, Bardien S, Beighton P and Bryer A (1997) Expanded CAG repeats in spinocerebellar ataxia (SCA1) segregate with distinct haplotypes in South African families. *Hum Genet* 100: 131-137.
- Ranum LP, Chung MY, Banfi S, *et al* (1994) Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: Evidence for familial effects on the age at onset. *Am J Hum Genet* 57: 244-252.
- Ranum LP and Day JW (2002) Dominantly inherited, non-coding microsatellite expansion disorders. *Curr Opin Genet Dev* 12: 266-271.
- Rasmussen A, Yescas P, Matsuura T, *et al* (2000) Molecular diagnosis of spinocerebellar ataxias in a Mexican population. *Am J Hum Genet* 67: 342.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, *et al* (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36: 585-595.
- Richards RI (2001) Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic diseases. *Hum Mol Genet* 10: 2187-2194.
- Rimoldi M, Servadio A, Zimarino V (2001) Analysis of heat shock transcription factor for suppression of polyglutamine toxicity. *Brain Res Bull* 56: 353-362.
- Rosenblum BB, Oaks F, Menchen S, Johnson B (1997) Improved singlestrand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 25: 3925-3929.
- Ross CA and Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10: 10-17.
- Sakahira H, Breuer P, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2002) Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16412-16418.
- Saleem Q, Choudhry S, Mukerji M *et al* (2000) Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: high frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation. *Hum Genet* 106: 179-187.
- Sanchez I, Mahlke C, Yuan J (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421: 373-379.
- Sanpei K, Takano H, Igarashi S, *et al* (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* 14: 277-284.

- Sasaki H (1999) Unstable expansion of CAG repeat and molecular mechanism of neurodegeneration in SCA1. *Nippon Rinsho* 57: 801-804.
- Sasaki H, Yabe I, Yamashita I, Tashiro K (2000) Prevalence of triplet repeat expansion in ataxia patients from Hokkaido, the northernmost island of Japan. *J Neurol Sci* 175: 45-51.
- Sasaki H, Yabe I, Tashiro K (2003) The hereditary spinocerebellar ataxias in Japan. *Cytogenet Genome Res* 100: 198-205.
- Schelhaas HJ, Ippel PF, Beemer FA, Hageman G (2000) Similarities and differences in the phenotype, genotype, and pathogenesis of different spinocerebellar ataxias. *Eur J Neurol* 7: 309-314.
- Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, *et al* (2002) Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51: 302-310.
- Schöls L, Amoiridis G, Buttner T, *et al* (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 42: 924-932.
- Schöls L, Kruger R, Amoiridis G, *et al* (1998) Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64: 67-73.
- Schöls L, Szymanski S, Peters S, *et al* (2000) Genetic background of apparently idiopathic sporadic cerebellar ataxia. *Hum Genet* 107: 132-137.
- Schöls L, Bauer I, Zühlke C, *et al* (2003) Do CTG expansions at the SCA8 locus cause ataxia? *Ann Neurol* 54: 110-115.
- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, *et al* (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3: 291-304.
- Sequeiros J and Coutinho P (1993) Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol* 61: 139-153.
- Shintani T and Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306: 990-995.
- Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, *et al* (1996) Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology* 46: 214-218.
- Silveira I, Miranda C, Guimarães L, *et al* (2002) Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG) n allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol* 59: 623-629.
- Sinha KK, Worth PF, Jha DK, *et al* (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in eastern India. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 75: 448-452.
- Siyanova EY and Mirkin SM (2001) Expansion of trinucleotide repeats. *Mol Biol* 35: 168-182.
- Sobue G, Doyu M, Nakao N, *et al* (1996) Homozygosity for Machado-Joseph disease gene enhances phenotypic severity. *J Neurol, Neurosurgery Psychiatry* 60: 354-356.
- Soong B, Cheng C, Liu R, Shan D (1997) Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Ann Neurol* 41: 446-452.
- Soong BW, Lu YC, Choo KB, Lee HY (2001) Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Taiwanese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Arch Neurol* 58: 1105-1109.
- Squitieri F, Andrew SE, Goldberg YP, *et al* (1994) DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum Mol Genet* 3: 2103-2114.

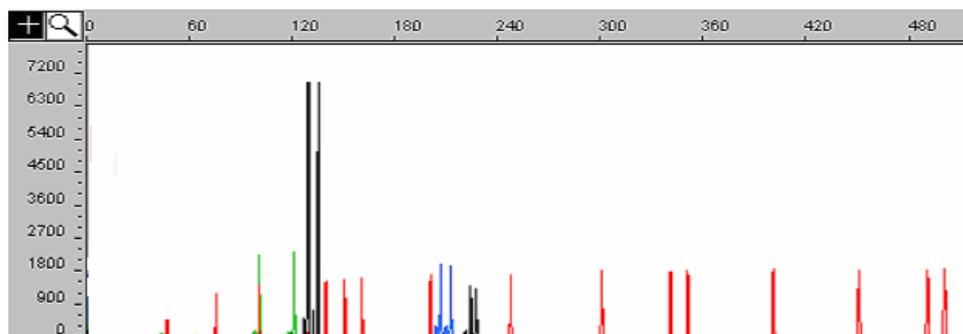
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, *et al* (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413: 739-743.
- Stevanin G, Lebre AS, Mathieux C, *et al* (1997) Linkage disequilibrium between the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease mutation and two intragenic polymorphisms, one of which, X359Y, affects the stop codon. *Am J Hum Genet* 60: 1548-1552.
- Stevanin G, Broussolle E, Streichenberger N, *et al* (2005) Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25). *Cerebellum* 4: 58-61.
- Storey E, du Sart D, Shaw JH, *et al* (2000) Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *Am J Med Genet* 95: 351-357.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- Subramony SH and Vig PJS (1998) Clinical aspects of spinocerebellar ataxia 1. In Wells RD and Warren ST (eds) *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. Academic Press, San Diego, pp 231-240.
- Subramony SH and Filla A (2001) Autosomal dominant spinocerebellar ataxias ad infinitum? *Neurology* 56: 287-289.
- Svendsen CN and Langston JW (2004) Stem cells for Parkinson disease and ALS: replacement or protection? *Nat Med* 10: 224-225.
- Swartz BE, Burmeister M, Somers JT, *et al* (2002) A form of inherited cerebellar ataxia with saccadic intrusions, increased saccadic speed, sensory neuropathy, and myoclonus. *Ann NY Acad Sci* 956: 441-444.
- Takano H, Cancel G, Ikeuchi T, *et al* (1998) Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 63: 1060-1066.
- Takiyama Y, Sakoe K, Namekawa M, *et al* (1998) A Japanese family with spinocerebellar ataxia type 6 which includes three individuals homozygous for an expanded CAG repeat in the SCA6/CACNL1A4 gene. *J Neurol Sci* 158: 141-147.
- Tan EK, Law HY, Zhao Y, *et al* (2000) Spinocerebellar ataxia in Singapore: predictive features of a positive DNA test? *Eur Neurol* 44: 168-171.
- Tan EK and Ashizawa T (2001) Genetic testing in spinocerebellar ataxias: defining a clinical role. *Arch Neurol* 58:191-195.
- Tang B, Liu C, Shen L, *et al* (2000) Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol* 57: 540-544.
- Teive HAG and Arruda WO (2004) A família Drew de Walworth: um século após a avaliação inicial finalmente o diagnóstico. *Arq Neuropsiquiatr* 62: 177-180.
- Thornton CA, Johnson K, Moxley RT (1994) Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol* 35: 104-107.
- Timchenko LT and Caskey CT (1996) Trinucleotide repeat disorders in humans: discussions of mechanisms and medical issues. *FASEB J* 10: 1589-1597.
- Tsai HF, Liu CS, Leu TM, *et al* (2004) Analysis of trinucleotide repeats in different SCA loci in spinocerebellar ataxia patients and in normal population of Taiwan. *Acta Neurol Scand* 109: 355-360.

- Trott A, Jardim LB, Saraiva-Pereira ML, *et al* (2006) Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet* 70: 173-176.
- Usdin K and Grabczyk E (2000) DNA repeat expansions and human diseases. *Cell Mol Life Sci* 57: 914-931.
- van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM (2003) A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 72: 191-199.
- van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC (2002) Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58: 702-708.
- van de Warrenburg BP, Hendriks H, Durr A, *et al* (2005) Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a study in a Dutch-French cohort. *Ann Neurol* 57: 505-512.
- Velazquez-Perez L, Garcia R, Santos FN, *et al* (2001) Hereditary ataxias in Cuba. Historical, epidemiological, clinical, electrophysiological and quantitative neurological features. *Rev Neurol* 32: 71-76.
- Verbeek DS, Schelhaas JH, Ippel EF, *et al* (2002) Identification of a novel SCA locus (SCA19) in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family on chromosome region 1p21-q21. *Hum Genet* 111: 388-393.
- Verbeek DS, van de Warrenburg BP, Wesseling P, *et al* (2004) Mapping of the SCA23 locus involved in autosomal dominant cerebellar ataxia to chromosome region 20p13-12.3. *Brain* 127: 2551-2557.
- Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, *et al* (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65: 905-914.
- Voges D, Zwickl P and Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-1068.
- Vuillaume I, Devos D, Schraen-Maschke S, *et al* (2002) A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1. *Ann Neurol* 52: 666-670.
- Warren ST (1996) The expanding world of trinucleotide repeats. *Science* 271: 1374-1375.
- Watanabe H, Tanaka F, Matsumoto M, *et al* (1998) Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Clin Genet* 53: 13-19.
- Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, *et al* (2006) Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet* [Epub ahead of print].
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110: 385-397.
- Williams LC, Hegde MR, Herrera G, *et al* (1999) Comparative semi-automated analysis of (CAG) repeats in the Huntington disease gene: use of internal standards. *Mol Cell Probes* 13: 283-289.
- Worth PF, Giunti P, Gardner-Thorpe C, *et al* (1999) Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3. *Am J Hum Genet* 65: 420-426.
- Xia H, Mao Q, Eliason SL, *et al* (2004) RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10: 816-820.
- Yabe I, Sasaki H, Yamashita I, *et al* (2001) Clinical trial of acetazolamide in SCA6, with assessment using the Ataxia Rating Scale and body stabilometry. *Acta Neurol Scand* 104: 44-47.

- Yabe I, Sasaki H, Chen DH, *et al* (2003) Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma. *Arch Neurol* 60: 1749-1751.
- Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, *et al* (2002) Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis* 10: 88-99.
- Yu GY, Howell MJ, Roller MJ, *et al* (2005) Spinocerebellar ataxia type 26 maps to chromosome 19p13.3 adjacent to SCA6. *Ann Neurol* 57: 349-354.
- Zhang X, Smith DL, Meriin AB, *et al* (2005) A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 892-897.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, *et al* (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15: 62-69.
- Zoghbi HY (1997) CAG Repeats in SCA6; Anticipating new clues. *Neurology* 49: 1196-1199.
- Zoghbi HY (2000) Spinocerebellar ataxias. *Neurobiol Dis* 7: 523-527.

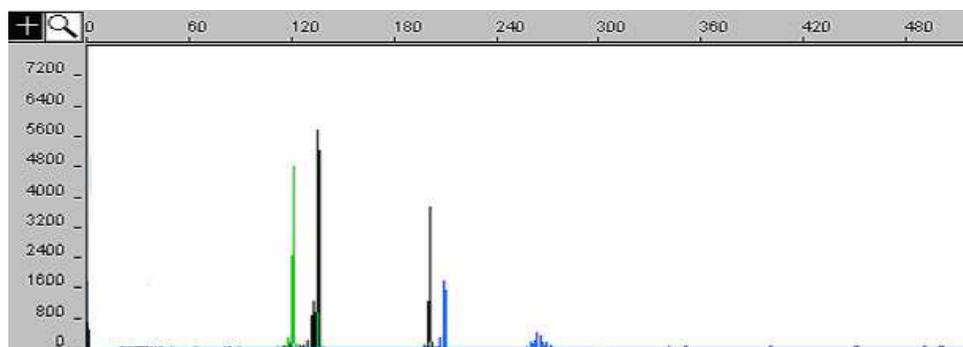
ANEXOS

Anexo I – Eletroferograma da eletroforese capilar de uma amostra normal.



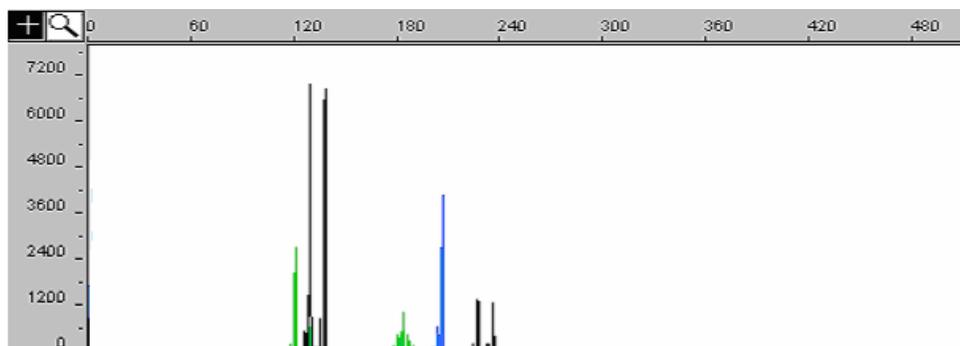
O tamanho do fragmento (em pb) está representado na parte superior; a intensidade de fluorescência está representada na parte esquerda. As cores indicam os fluorocromos utilizados: SCA1, 6-FAM (azul); SCA2, VIC (verde); SCA3 e SCA6, NED (preto); marcador de peso molecular, ROX (vermelho). SCA1: 206 pb e 212 pb (29 CAG e 31 CAG); SCA2: 100 pb e 121 pb (15 CAG e 22 CAG); SCA3: 223 pb e 226 pb (23 CAG e 24 CAG); SCA6: 129 pb e 135 pb (11 CAG e 13 CAG).

Anexo II – Eletroferograma da eletroforese capilar de uma amostra com uma expansão no gene SCA1.



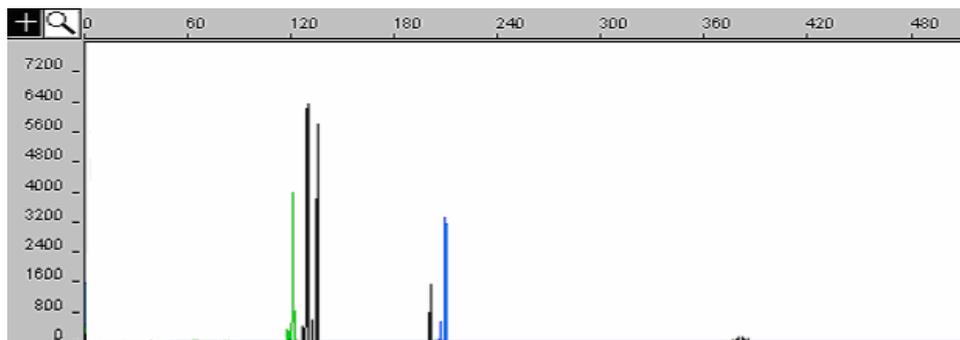
O tamanho do fragmento (em pb) está representado na parte superior; a intensidade de fluorescência está representada na parte esquerda. As cores indicam os fluorocromos utilizados: SCA1, 6-FAM (azul); SCA2, VIC (verde); SCA3 e SCA6, NED (preto). SCA1: 209 pb e 260 pb (30 CAG, 47 CAG), SCA2: 121 pb e 121 pb (22 CAG e 22 CAG), SCA3: 199 pb e 199 pb (15 CAG e 15 CAG), SCA6: 135 pb e 135 pb (13 CAG e 13 CAG).

Anexo III – Eletroferograma da eletroforese capilar de uma amostra com uma expansão no gene SCA2.



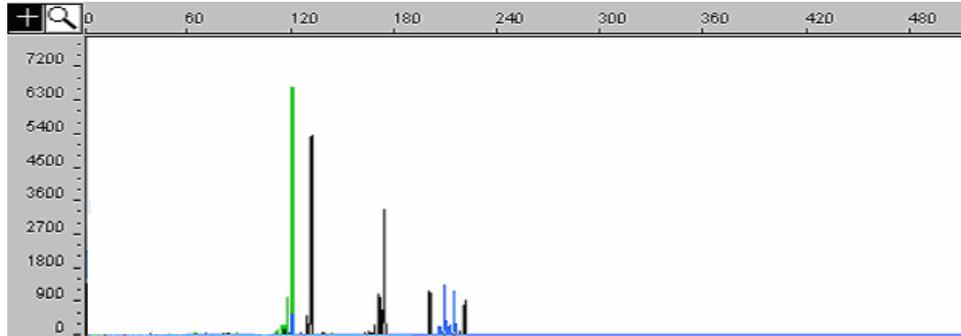
O tamanho do fragmento (em pb) está representado na parte superior; a intensidade de fluorescência está representada na parte esquerda. As cores indicam os fluorocromos utilizados: SCA1, 6-FAM (azul); SCA2, VIC (verde); SCA3 e SCA6, NED (preto). SCA1: 206 pb e 206 pb (29 CAG e 29 CAG), SCA2: 121 pb e 181 pb (22 CAG e 42 CAG), SCA3: 226 pb e 235 pb (24 CAG e 27 CAG), SCA6: 129 pb e 138 pb (11 CAG e 14 CAG).

Anexo IV – Eletroferograma da eletroforese capilar de uma amostra com uma expansão no gene SCA3.



O tamanho do fragmento (em pb) está representado na parte superior; a intensidade de fluorescência está representada na parte esquerda. As cores indicam os fluorocromos utilizados: SCA1, 6-FAM (azul); SCA2, VIC (verde); SCA3 e SCA6, NED (preto). SCA1: 209 pb e 209 pb (30 CAG e 30 CAG), SCA2: 121 pb e 121 pb (22 CAG e 22 CAG), SCA3: 199 pb e 379 pb (15 CAG e 75 CAG), SCA6: 129 pb e 135 pb (11 CAG e 13 CAG).

Anexo V – Eletroferograma da eletroforese capilar de uma amostra com uma expansão no gene SCA6.



O tamanho do fragmento (em pb) está representado na parte superior; a intensidade de fluorescência está representada na parte esquerda. As cores indicam os fluorocromos utilizados: SCA1, 6-FAM (azul); SCA2, VIC (verde); SCA3 e SCA6, NED (preto). SCA1: 209 pb e 215 pb (30 CAG e 32 CAG), SCA2: 121 pb e 121 pb (22 CAG e 22 CAG), SCA3: 199 pb e 220 pb (15 CAG e 22 CAG), SCA6: 132 pb e 174 pb (12 CAG e 26 CAG).