

Anna Martha Vaitses Fontanari<sup>a</sup>; Vanessa Erichsen<sup>a,b</sup>; Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>a,d,e</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>c</sup> Serviço de Pneumologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

<sup>d</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

A ataxia espinocerebelar de tipo 10 (SCA10) é uma doença de herança autossômica dominante caracterizada por atrofia cerebelar com ataxia e, em certos casos, convulsões. Até o momento, a SCA10 foi descrita apenas em pacientes mexicanos e brasileiros. Sua etiologia relaciona-se ao aumento do número de repetições do pentanucleotídeo ATTCT no gene *ATXN10*, que oscilam de 10 a 29 em indivíduos normais e de 800 a 4500 em afetados. Tal variação dificulta sua identificação e diagnóstico através do *PCR convencional*.

Amostras de DNA de 230 pacientes e de 3 controles positivos foram incluídas no estudo. Após a amplificação, fez-se análise por eletroforese capilar. A identificação de alelos mutantes (expandidos) é obtida através da visualização de um perfil eletroforético característico, o qual foi confirmado nas amostras controle.

Na amostra estudada, foram encontrados 9 casos novos de pacientes com SCA10, através da identificação de alelos mutantes longos. Esses dados aumentam o número de pacientes brasileiros com a doença, confirmando a ocorrência desta patologia no nosso meio. Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia empregada é adequada para a identificação de alelos mutantes no gene *ATXN10*, podendo ser utilizada no diagnóstico de pacientes com SCA10.

## Introdução

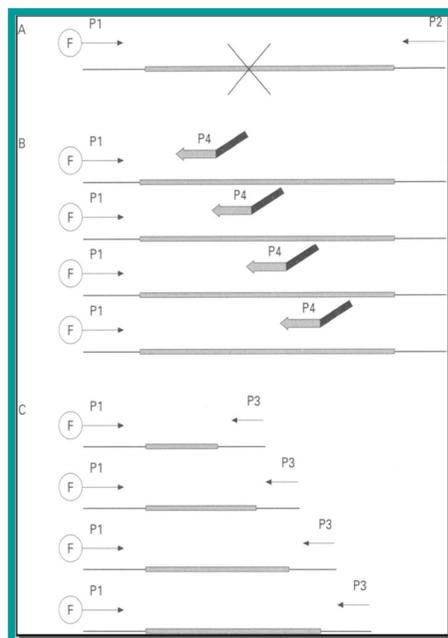
Ataxias espinocerebelares são um grupo de doenças neurodegenerativas tanto clínica quanto molecularmente heterogêneas. Dentre elas, a ataxia espinocerebelar do tipo 10 (SCA10), forma autossômica dominante de ataxia, destaca-se por sua etiologia relacionada a expansões pentanucleotídicas em porções intrônicas. Tais repetições oscilam entre 10 e 29 na população normal e de 800 a 4 500 nos indivíduos afetados – o que lhe torna a maior expansão de microssatélites conhecida no DNA humano.

Até o momento mais de trinta ataxias autossômicas dominantes foram descritas geneticamente. Sua diferenciação, na rotina laboratorial, dá-se através do *PCR convencional*, enquanto que sua caracterização exige técnicas menos ágeis, como o *southern blot*. Aquele, embora rápido se comparado a este, falha no diagnóstico de expansões demasiadamente longas, tal qual ocorre no gene *ATXN10*, elevando a incidência de falsos negativos.

Uma alternativa é a técnica TP-PCR (*triplet repeat primed PCR*), na qual se faz uso de três primers: um marcado com fluorescência e específico ao gene a ser estudado (P1) e outros dois contendo uma seqüência âncora em comum (P3 e P4). Nos primeiros ciclos os primers P1 e P4 amplificam diversas porções das expansões, cuja especificidade deve-se somente ao primeiro. Por encontrar-se em menor quantidade que P3, o primer P4 exauri-se mais rapidamente. Segue-se a conexão de P3 à âncora inserida por P4 na extremidade dos fragmentos e um longo período de expansão que possibilita a amplificação de seqüências mais longas (figura 1).

Figura 1. Fundamentação metodológica do TP-PCR.

A linha representa a região gênica não-repetitiva, enquanto a porção hachurada as repetições nucleotídicas. P1 é o primer locus específico marcado com fluoróforo (F), P3 é o primer idêntico a cauda (C) de nucleotídeos presente em P3. A porção hachurada representa as repetições nucleotídicas. A) Demonstra que a expansão é demasiadamente longa para ser amplificada por PCR normal. B) Ciclos iniciais da PCR, onde o P4 se anela em múltiplos sítios dentro da região de repetições nucleotídicas no alelo, formando uma mistura de produtos. C) P3 ampliará a partir do produto final das amplificações dos ciclos anteriores, pois é correspondente a cauda inserida por P4. Figura retirada de Warner *et al* (1996).



## Resultados

A figura 2 representa a análise de algumas amostras como um modelo dos resultados obtidos e a forma de interpretação dos mesmos. O mesmo tipo de análise foi realizado para todas as 230 amostras do grupo e foram encontradas no total 9 amostras de DNA com perfil eletroforético na eletroforese capilar semelhante as amostras utilizadas como controle positivo. Todas as amostras positivas foram confirmadas pela realização dos testes em duplicata. Convém ainda salientar que não foram detectadas falhas na amplificação pela PCR e também não foram identificados produtos secundários de amplificação.

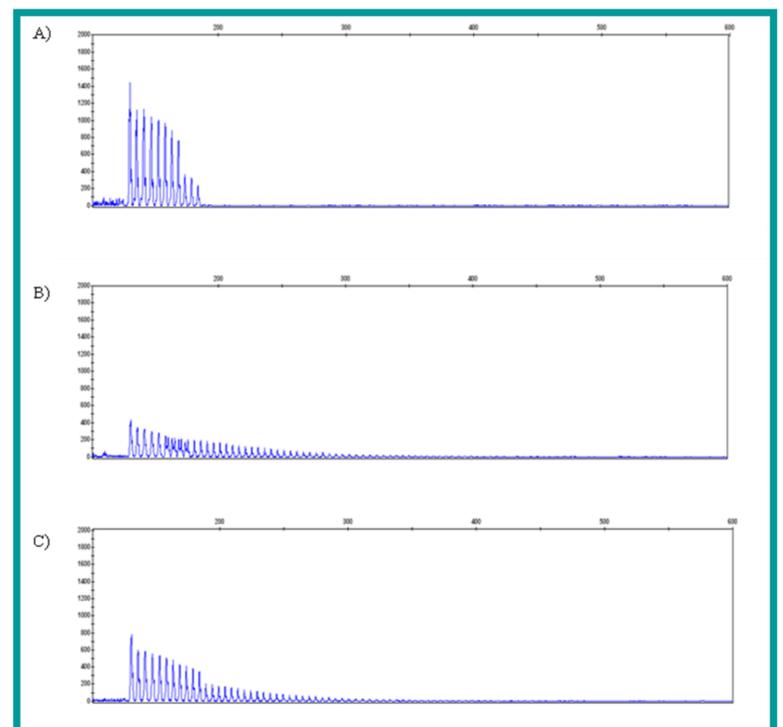


Figura 2. Identificação de alelos mutantes longos no gene *ATXN10*.

A) Perfil de uma amostra de DNA com repetições de pentanucleotídeos dentro da faixa normal (controle negativo); B) Perfil de uma amostra de DNA com repetições de pentanucleotídeos acima da faixa de normalidade (controle positivo); C) Perfil de amostra de DNA de um paciente com ataxia espinocerebelar identificando o perfil característico da presença de um alelo mutante longo, confirmando o diagnóstico de SCA10.

## Discussão e conclusão

O TP-PCR é uma técnica sensível, específica e reprodutível, podendo ser utilizada no diagnóstico de SCA10. As amostras de pacientes positivos apresentaram um padrão eletroforético compatível com a separação de fragmentos de tamanhos variados, que é a característica principal de amostras que apresentam repetições nucleotídicas quando analisadas por TP-PCR.

Os novos casos encontrados deverão ser analisados por *southern blot* para uma completa validação e confirmação dos resultados obtidos. Entretanto, a correta e reprodutível identificação das amostras empregadas como controles positivos indicam que todos os casos positivos dessa amostra foram adequadamente identificados.

Por fim, o diagnóstico desses novos pacientes aumenta o número de casos de SCA10 no nosso meio e indica a necessidade de avaliação dessa doença em pacientes com manifestações clínicas compatíveis com ataxia cerebelar.

## Objetivos

Identificar alelos mutantes longos no gene *ATXN10* através do *tripled repeat primed* (TP-PCR) e da eletroforese capilar em amostras de pacientes com suspeita clínica de ataxia espinocerebelar.

## Materiais e métodos

### Amostras Biológicas

230 pacientes com suspeita clínica de ataxia.  
3 controles positivos.

Extração de DNA de sangue periférico por *Salting-Out*.

Quantificação pelo método fluorimétrico *Quant-It*<sup>®</sup>.

TP-PCR

Análise dos Fragmentos da PCR através da eletroforese no analisador genético ABI 3130xl e do programa *GeneMapper*.

Interpretação dos resultados