UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

LARISSA MENDES PEREIRA

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES DE PACIENTES COM ATAXIAS ESPINOCEREBELARES NO ESTADO DO PARÁ

BELÉM
2017

LARISSA MENDES PEREIRA

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES DE PACIENTES COM ATAXIAS ESPINOCEREBELARES NO ESTADO DO PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

BELÉM

2017

LARISSA MENDES PEREIRA

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES DE PACIENTES COM ATAXIAS ESPINOCEREBELARES NO ESTADO DO PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, aprovado com o conceito:

_____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva – ICB–UFPA

_____

Profª.Drª. Fernanda Andreza de Pinho Lott Figueiredo – ICB–UFPA

_____

Prof.Dr.Carlos Eduardo de Melo Amaral – ICB-UFPA

_____

Profª. Drª. Patrícia do Socorro Queiroz Feio (Suplente) -ICS-UFPA

_____

“A raridade de uma doença não exclui a sua existência.”

Luiz Carlos Santana da Silva

Dedico este trabalho a todos
que sofrem de Doenças Raras.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grandioso Deus, pois minha fé Nele foi o que me manteve de pé.

À minha mãe, por todo esforço e determinação na minha criação, e por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis. Sei que para você não foi fácil a vida, mas a tenho como inspiração, e com muita felicidade eu digo: CONSEGUI, MÃE!!!

Aos meus familiares, principalmente minha irmã Lorena que não mede esforços para me ajudar, não somente na rotina acadêmica, mas por toda a vida.

Ao meu orientador Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, pela oportunidade oferecida, ensinamentos e amizade adquirida ao longo desses quatro anos que faço parte do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM).

Ao CNPQ, pela bolsa de iniciação científica.

Ao meu amor, João Pereira, por todos os dias difíceis em que esteve presente, me dando apoio e lindas palavras de incentivo, e principalmente pelos dias de vitória que compartilhamos juntos.

Aos meus amigos do LEIM, em especial, Janaína Figueira, Ingrid Luiza, Wemilly Sarrazin, Morgana Soares, João Jorge e Bruno Fernando, pois sempre que precisei, não só dentro do laboratório, como fora, estavam lá para me distrair, apoiar e tirar minhas dúvidas.

Aos meus amigos da faculdade de Biomedicina, Natália Virgínia, João Marcos, Aliane Coelho e Jéssica Rodrigues, pelos momentos de diversão e descontração e muito trabalho em cima da hora.

A todos que contribuíram neste meu processo de crescimento pessoal e profissional, muito obrigada!

SUMÁRIO

1. Introdução_____6

1.1 Ataxias autossômicas dominantes _____6

1.2 Distribuição geográfica _____7

1.3 Características genéticas das SCAs_____7

1.4 Justificativa _____9

2. Artigo anexado_____10

3. Considerações Finais_____25

4. Referências Bibliográficas _____26

5. Anexo: Normas da revista_____28

RESUMO

Introdução: As ataxias espinocerebelares (SCAs) compreendem um grupo de doenças autossômicas dominantes que atingem os neurônios motores do cerebelo. Geralmente iniciam com disartria e distúrbio da marcha. A principal característica das mutações são as expansões de repetições CAG, produzindo uma proteína rica em poliglutamina. **Objetivo:** Caracterizar os aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares de pacientes com SCAs no estado do Pará. **Metodologia:** Participaram 59 pacientes com suspeita clínica de ataxia. Os aspectos clínicos e epidemiológicos foram coletados dos prontuários dos pacientes. A extração de DNA foi realizada por kit comercial, a amplificação dos genes das respectivas SCAs pelo método de MLPA e, posteriormente eletroforese capilar. As expansões CAG foram formuladas no software GeneMapper. **Resultados e Discussão:** Dos 59 indivíduos, 30 são mulheres e 29 homens, com média de idade de 34 anos (DP=14,8) e idade média do aparecimento dos sintomas com 30 anos (DP=14,3). Nos 21 pacientes com resultado positivos para uma das SCAs analisadas, o número de repetições CAG foi inversamente proporcional à idade de início dos sintomas (p=0,0032; ANOVA)**. Conclusão:** Dessa forma é possível diagnosticar indivíduos com sintomas de ataxia, ajudar as famílias através do aconselhamento genético e do diagnóstico precoce, e iniciar mais estudos destas doenças na região.

Palavras-chave: SCA; Diagnóstico; Região-Norte; MLPA;

1. INTRODUÇÃO

O termo “ataxia” de terminologia grega significa “fora de controle”. Este termo tem sido utilizado por médicos, para referir-se a distúrbios no controle da postura do corpo, na coordenação motora, no controle da fala e nos movimentos oculares encontrados em pacientes com suspeita clínica de ataxia. Os distúrbios causados pelo comprometimento do cerebelo e suas conexões são denominados Ataxias Cerebelares. Este comprometimento pode ser atribuído a causas primárias, como em ataxias congênitas e hereditárias; ou a causas secundárias, em ataxias decorrentes de doenças como a esclerose múltipla, tumores, doença vascular encefálica, drogas, infecções, além de síndrome paraneoplásicas, doenças endócrinas e doenças autoimunes (HARDING, 1983).

Em 1863, Nicolaus Friedreich relatou o primeiro tipo de ataxia primária hereditária com sintomas clínicos de ataxia, cifoescoliose e pé cavo. A partir de então outros autores passaram a descrever diversos sintomas distintos de ataxia, surgindo então, as primeiras classificações das doenças cerebelares (ALBANO, 2000).

As ataxias cerebelares manifestam-se como ataxias dominantes ou recessivas. A denominação ataxia espinocerebelar tem sido utilizada para designar ambas, porém é mais comum a utilização do termo para as ataxias dominantes. As formas recessivas são bastante peculiares, com poucas características em comum, desta maneira, não são classificadas por acrômios, como exemplo a ataxia de Friedreich, a ataxia telangectasia, assim como as ataxias caracterizadas por defeitos metabólicos, a exemplo da ataxia por deficiência de vitamina E (TROTT, 2006).

1.1. Ataxias autossômicas dominantes

As Ataxias Espinocerebelares, ou SCAs, do inglês *Spinocerebellar ataxia*, compõe um grupo de desordens neurológicas causadoras da perda progressiva de neurônios do cerebelo e suas conexões. Com uma incidência mundial de 1 a 5 casos a cada 100.000 habitantes (RUANO et al., 2014), as SCAs possuem uma grande heterogeneidade clínica, com manifestações que geralmente surgem na vida adulta, em média, a partir dos 30 anos de idade. Os indivíduos afetados apresentam uma série de achados neurológicos cerebelares, entre eles, a ataxia axial, nistagmo, disfagia, disartria, dismetria, decomposição dos movimentos, disdiadococinesia e

tremor intencional, resultantes do envolvimento do cerebelo e suas vias aferentes e eferentes (HARDING, 1983).

A nomenclatura das SCAs é estabelecida de acordo com a ordem de suas descobertas. Atualmente, 41 loci gênicos de SCA já foram mapeados. Entre estas, nove tipos de SCAs possuem diagnóstico molecular no Brasil: SCA 1, SCA 2, SCA 3 (Doença de Machado-Joseph), SCA 6, SCA 7, SCA 10, SCA 12, SCA 17 E DRPLA (Dentatorubral-pallidoluysian atrophy) (CASTILHOS et al., 2013).

1.2. Distribuição geográfica:

As SCAs mais frequentes são os tipos SCA 3 ou DMJ (21%), SCA 2 e SCA 6 (15%), SCA 1 (6%) e SCA 7 (5%). Em Cuba, a prevalência de SCA2 é a mais elevada do mundo, surgindo em média 43 casos a cada 100.000 habitantes. Em Portugal, no arquipélago dos Açores, a SCA3/DMJ apresenta prevalência de 1 para 2.402 habitantes (BIRD et al., 2016).

No Brasil, as SCAs mais frequente são SCA3, seguida pela SCA2 e SCA1(CASTILHOS et al., 2013). No estado do Rio Grande do Sul foram avaliados 104 casos de SCA sendo a proporção de casos de DMJ mais alta em relação às outras SCAs, estimando-se em 1,8: 100.000 e 0,2: 100.000 respectivamente, sugerindo um efeito fundador açoriano (JARDIM et al., 2001).

Observa-se uma correlação entre origem étnica e a prevalência de determinada mutação que causa SCA. A prevalência das diferentes ataxias varia conforme o país e as características étnicas de cada região do mesmo. Dessa forma, a frequência alélica das expansões também é característica para cada população (BRUSCO et al., 2004).

1.3. Características genéticas das SCAS:

Entre as características mais marcantes das SCAS, observa-se a expressividade variável, inclusive em uma mesma família. Podendo várias pessoas manifestar os sintomas de uma determinada SCA, entretanto com diferenças na progressão da gravidade, variedade e idade de início dos sintomas. A história familiar é consistente com a herança autossômica dominante de um único gene principal, mas

os fenótipos resultantes são individualmente tão heterogêneos que não podem ser extrapolados para servirem de critério diagnóstico para casos de fora dessa família (HARDING, 1984).

Com o avanço da genética molecular, foi possível comprovar que as SCAs são causadas por mutações em genes distintos. A principal característica das mutações encontradas nas SCAs é o aumento do número de repetições de uma determinada sequência de nucleotídeos acima do valor encontrado em indivíduos sem histórico da doença (SOONG e PAULSON, 2007).

Nas oito SCAs que são o foco deste trabalho, a expansão do trinucleotídeo CAG, o qual codifica uma glutamina, é a causa mais frequente. Diversos estudos caracterizaram esta expansão como causadora das SCAs do tipo SCA1, SCA2, SCA3/DMJ, SCA6, SCA7, SCA17 e DRPLA, ocorrendo na região de codificação dos respectivos genes (SOONG e PAULSON, 2007). Porém, a SCA12 é causada por uma expansão (CAG)n na região promotora 5' do gene PPP2R2B (PAULSON e SUBRAMONY, 2002). Como podem ser observadas no quadro 1.

A função da proteína produzida pelos genes na maioria das ataxias ainda é desconhecida, porém a introdução de um segmento mais longo de glutaminas é a causa da doença em muitos dos casos, indicando um mecanismo comum de toxicidade. A patogênese gerada por expansões de poliglutaminas (poliQ) envolve uma proteólise específica das proteínas alteradas, gerando fragmentos tóxicos com longos tratos de poliglutamina, que agregam e são acumulados em corpos de inclusão nos neurônios (WARRICK et al., 1998).

O fenômeno da antecipação é uma correlação inversa entre o tamanho da expansão CAG encontrada no alelo mutante e a idade de início da doença, claramente observado na SCA2 e SCA7. A expansão CAG é instável tanto na meiose como na mitose, sendo que filhos de afetados tendem a começar a apresentar a doença mais cedo (PAULSON, 2007).

Quadro 1: Genética molecular das SCAs com diagnóstico no Brasil (Adaptado de JARDIM e SAUTE, 2008).

SCA	Gene	Proteína	Tipo de mutação
SCA1	ATXN1	Ataxina-1	Expansão CAG entre 39 e 81 repetições puras
SCA2	ATXN2	Ataxina-2	Expansão CAG mais de 32 repetições puras
SCA3	ATXN3	Ataxina-3	Expansão CAG entre 54 e 86
SCA6	CACNA1A	Subunidade 1A do canal de cálcio	Expansão CAG entre 21 e 33
SCA7	ATXN7	Ataxina-7	Expansão CAG entre 36 e 450
SCA12	PPP2R2B	Subunidade B isoforma beta regulatória de 55-kd de fosfatase serina/ treonina 2A	Repetição CAG em aparente região promotora do gene, maior que 51 repetições
SCA17	TBP	Proteína ligante de TATA-box	Expansão CAG/CAA entre 43 e 66
DRPLA	ATN	Atrofina-1	Expansão CAG entre 48 e 93

1.4. JUSTIFICATIVA

As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes têm sido objeto de importantes estudos, visando estabelecer a identificação das mutações e a compreensão da fisiopatologia, além dos aspectos clínicos e epidemiológicos das mesmas. Com o avanço das pesquisas, muito foi descoberto sobre as SCAs, com um aumento substancial na quantidade de *loci* envolvidos nas diferentes ataxias.

Levando em consideração o número significativo de famílias afetadas com essas doenças neurodegenerativas, principalmente na Região Sul do Brasil, e a dificuldade do diagnóstico clínico e molecular juntamente ao aconselhamento genético, necessita-se expandir os estudos sobre as SCAs para outras áreas do país.

2. ARTIGO

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES DE PACIENTES COM ATAXIAS ESPINOCEREBELARES NO ESTADO DO PARÁ

LARISSA MENDES PEREIRA[1], LARISSA GIORDANA DA CRUZ[2]; LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA[1].

[1] Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém (PA) – Brasil.
[2] Laboratório Amaral Costa, Belém (PA) – Brasil.

(Não submetido)

Revista: Genetics and Molecular Biology
ISSN 0100-8455

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES DE PACIENTES COM ATAXIAS ESPINOCEREBELARES NO ESTADO DO PARÁ

LARISSA MENDES PEREIRA[1], LARISSA GIORDANA DA CRUZ[2]; LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA[1].

[1] Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém (PA) – Brasil.
[2] Laboratório Amaral Costa, Belém (PA) – Brasil.

Short Title: CLINICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF PATIENTS WITH SPINOCEREBELAR AXIS IN THE STATE OF PARÁ

Number of the pages: 13 ; Number of tables: 2 ; Grafics: 2 ; Figures:1

*Correspondig author:
Dr. Luiz Carlos Santana da Silva.
Universidade Federal do Pará, Cidade Universitária Prof. José da Silveira Netto, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Rua Augusto Corrêa, 01 – Guamá. Caixa Postal:8615; 66075 – 970 Belém, Pará, Brazil.
Phone/Fax - +55 91 3201-8030.
E-mail: lcsantana-pa@hotmail.com or lcss@ufpa.br
Grant sponsorship: INAGEMP/CNPq

The authors have declared that no competing interest exist

Resumo:

Introdução: As ataxias espinocerebelares (SCAs) compreendem um grupo de doenças autossômicas dominantes que atingem os neurônios motores do cerebelo. Geralmente iniciam com disartria e distúrbio da marcha. A principal característica das mutações são as expansões de repetições CAG, produzindo uma proteína rica em poliglutamina. **Objetivo:** Caracterizar os aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares de pacientes com SCAs no estado do Pará. **Metodologia:** Participaram 59 pacientes com suspeita clínica de ataxia. Os aspectos clínicos e epidemiológicos foram coletados dos prontuários dos pacientes. A extração de DNA foi realizada por kit comercial, a amplificação dos genes das respectivas SCAs pelo método de MLPA e, posteriormente eletroforese capilar. As expansões CAG foram formuladas no software GeneMapper. **Resultados e Discussão:** Dos 59 indivíduos, 30 são mulheres e 29 homens, com média de idade de 34 anos (DP=14,8) e idade média do aparecimento dos sintomas com 30 anos (DP=14,3). Nos 21 pacientes com resultado positivos para uma das SCAs analisadas, o número de repetições CAG foi inversamente proporcional à idade de início dos sintomas (p=0,0032; ANOVA)**.** **Conclusão:** Dessa forma é possível diagnosticar indivíduos com sintomas de ataxia, ajudar as famílias através do aconselhamento genético e do diagnóstico precoce, e iniciar mais estudos destas doenças na região.

INTRODUÇÃO

As Ataxias Espinocerebelares (SCAs) são um grupo heterogêneo de desordens neurológicas causadoras de degeneração progressiva de células do cerebelo e cordão espinhal. Possuem herança autossômica dominante e idade de início tardia. Atualmente, cerca de 41 *loci* gênicos foram descritos para as SCAs(1,2).

A principal característica das mutações é a expansão de repetições nucleotídicas. Sete tipos de SCAs (SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, SCA17 e dentatorubro-pallidoluysian atrophy, DRPLA) são causados pela expansão da repetição da trinca de nucleotídeos CAG na região codificadora, produzindo uma proteína rica em poliglutamina. Porém, na SCA12, a expansão da repetição CAG, ocorre na região promotora 5’ do gene PPP2R2B (1,2).

Cada tipo de SCA é individualmente rara no mundo, com frequências variáveis entre as populações. A mais frequente é a Doença de Machado-Joseph (SCA3/MJD),

seguida pela SCA2, SCA1 e SCA6 (3). No Brasil, a mais frequente é a SCA3/MJD devido à colonização açoriana no país, mais predominante da Região Sul (4)

As manifestações clínicas incluem: ataxia cerebelar, movimentos apendiculares, disfagia, disartria, uma síndrome piramidal, sinal de Babinski e espasticidade, uma progressiva oftalmoplegia externa de origem supranuclear, com limitação inicial de olhar para cima e para a convergência, e, menos frequentemente, oftalmoplegia nuclear, sinais extrapiramidais, incluindo distonia, rigidez e bradicinesia, doença do neurônio motor, com fasciculação e amiotrofia, a perda de sensibilidade, retração palpebral, perda de peso, e distúrbios do sono e alguns casos, porém raros, demência e perda de memória (5)

Cada tipo de SCA apresenta, individualmente, uma variação fenotípica na idade de início dos sintomas, manifestações neurológicas e taxa de progressão da doença. Nas SCAs causadas por expansões CAG, o tamanho dessa expansão da repetição trinucleotídica (Figura 1) é responsável por 45 – 80% da variação da idade de início dos sintomas (1,5). Outras explicações para a heterogeneidade clínica dessas doenças têm sido relacionadas a genes candidatos (6,7), como exemplo, fatores intrafamiliares (8,9,10) e padrões de metilação (11).

Figura 1: Base molecular de oito SCAs

Doença	**Gene**	**Número de Repetições CAG**			**Referência**
		Normal	**Intermediário***	**Expandido**	
SCA1	ATXN1	≤ 37	37-44	44-83	12
SCA2	ATXN2	≤30	31-34	35-54	13
SCA3	ATXN3	≤42	43-53	55-86	14,15
SCA6	CACNA1	≤18	-	21-33	16
SCA7	ATXN7	≤27	28-35	36-300	17
SCA12	PPP2R2B	≤32	33-54	55-78	18
SCA17	TBP	≤43	44-47	48-63	19
DRPLA	ATN	≤36	37-48	49-79	20

*A faixa intermediária é utilizada aqui para definir duas categorias de alelos: aqueles que são normais, mas podem expandir-se para anormal durante a transmissão e aqueles que mostram penetrância reduzida.

O presente estudo tem como objetivo caracterizar o perfil clínico, epidemiológico e molecular de pacientes com ataxias espinocerebelares de herança autossômica dominantes no Estado do Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Participaram deste estudo 59 pacientes com sintoma clínico de ataxia, devidamente encaminhados por médicos neurologistas do Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (HUBFS – UFPA). Dentre esses, 47 pacientes tiveram seus laudos para SCAs emitidos pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Os 12 pacientes restantes foram testados para implantação do diagnóstico molecular para SCA no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA (LEIM).

Perfil clínico-epidemiológico

Para caracterizar o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes, utilizou-se as informações contidas em seus prontuários, assim então calculou-se a média de idade ao exame, média de idade de início dos sintomas, e os principais achados clínicos no momento do exame físico e histórico familiar.

Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Adicionalmente, foi elaborado um termo de consentimento livre e esclarecido, que foi assinado por todos os pacientes ou responsáveis que concordaram em participar do referido estudo.

Extração e Quantificação do DNA

Foram colhidos 5,0 mL de sangue periférico em tubo com EDTA dos pacientes com ataxias. Em seguida, foi extraído o DNA por meio de método químico (21), com modificações. A quantificação foi realizada no equipamento NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, 1000) na concentração 10 ng/μL.

Amplificação do material genético

Os protocolos para o diagnóstico molecular foram baseados na técnica de PCR Multiplex (22) para a amplificação dos oito genes correspondentes a cada tipo de SCA, devidamente marcados com sondas fluorescentes. Para tanto foram elaborados dois Multiplex: Multiplex I (amplificação dos genes ATXN1, ATXN2, ATXN3, CACNA1A e ATXN7, correspondentes as SCAs 1, 2, 3, 6 e 7) e o Multiplex II (amplificação dos genes PPP2R2B, TBP e ATN, correspondentes as SCAs 12, 17 e DRPLA).

Em seguida foi realizada a eletroforese capilar no equipamento Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems – Life Technologies) e a expansão das repetições foram analisadas no software GeneMapper versão 4.1 (Life Technologies).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa Microsoft Excel 2013 (média e desvio padrão) e BioEstat 5.0 (ANOVA), considerando nível de significância $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Perfil Clínico e Epidemiológico

O grupo amostral compreendeu 59 indivíduos, sendo 30 mulheres e 29 homens, com média de idade de 34 anos (DP=14,8) e a idade média do aparecimento dos sintomas foi de 30 anos (DP=14,3).

Considerando os aspectos clínicos, foi possível verificar que todos os pacientes apresentaram como principal sintoma clínico a ataxia. Dentre os outros sintomas, os mais comuns foram a disfagia/disartria, alterações de neurocondução e rigidez. A distribuição dos sintomas pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos sintomas encontrados nos 59 indivíduos analisados.

Sintomas	***Frequência Relativa***	***Frequência Absoluta***
Ataxia	100,0%	59
Disfagia/Disartria	42,4%	25
Alterações de neurocondução	35,6%	21
Rigidez	33,8%	20
Alterações no movimento ocular	27,11%	16
Nistagmo	15,25%	9
Alterações cognitivas	11,8%	7
Perda da acuidade visual	8,5%	5
Tremor de repouso	8,5%	5

Histórico Familiar

Dos 59 indivíduos, 22 apresentaram história familiar consistente com herança autossômica dominante, relatando que os sintomas de ataxias já apareceram em mais de um indivíduo na mesma família. Entretanto, não se pode desconsiderar os demais, visto que estes tipos de doença, por serem heterogêneas, podem se manifestar de maneiras diferentes em indivíduos de uma mesma família. Assim como, em alguns casos em que os indivíduos não souberam informar a ocorrência da doença em demais membros da família, devido óbito por outra causa, antes da faixa etária considerada comum para o surgimento da doença.

Caracterização molecular

Inicialmente foram amplificadas sete regiões codificadoras (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, DRPLA) e uma região promotora (SCA12) de 12 pacientes com suspeita de SCA. Pelo método de MLPA foram diagnosticados dois pacientes com SCA: um com SCA1 e outro com SCA3. Os demais apresentaram expansão das repetições dentro da faixa de normalidade.

Na eletroforese capilar foi possível fazer diagnóstico quantitativo em relação ao tipo de SCA, levando em consideração o tamanho do fragmento amplificado, de acordo com o número de repetições que o paciente apresentava.

O número de repetições foi estabelecido através das fórmulas calculadas para cada tipo de SCA (Tabela 2), levando em consideração as faixas de repetição CAG (normal, intermediário e expandida), o número de pares de base (pb) encontrados nos gráficos da eletroforese capilar descontando as regiões que não contém as repetições e os *primers* utilizados em cada amplificação.

Tabela 2: Faixas de repetições CAG encontradas nos pacientes.

Doença	Gene	Sonda	Amplicon (CAG)n***	Faixa de repetições**	Faixa de repetições mutante*
SCA 1 (3)*	ATXN1	6-FAM	(pb -122)/2,88	14 – 62	51 – 62
SCA 2 (1)*	ATXN2	VIC	(pb -57)/2,88	21 – 47	47 – 47
SCA 3 (17)*	ATXN3	NED	(pb -160)/2,88	24 – 63	59 - 63
SCA 6	CACNA1A	NED	(pb -99)/2,88	6 – 11	-
SCA 7	ATXN7	VIC	(pb -252)/2,88	7 – 19	-
SCA 12	PPP2R2B	VIC	(pb -133)/2,88	12 – 25	-
SCA 17	TBP	NED	(pb -176)/2,88	28 – 38	-
DRPLA	ATN	PET	(pb -214)/2,88	13 – 24	-

*Pacientes encontrados com repetições dentro da faixa mutante.

** Repetições mínimas e máximas encontradas nos pacientes analisados.

***Fórmula para estabelecer o número de (CAG)n, levando em consideração o decréscimo do tamanho dos *primers* e região anterior e posterior do início e final das repetições.

Dentre os 59 pacientes, 21 apresentaram diagnóstico para uma das SCAs investigadas. Em relação aos demais não se pode afirmar que não apresentam um tipo de SCA, uma vez que foram analisados oito tipos (Gráfico 1).

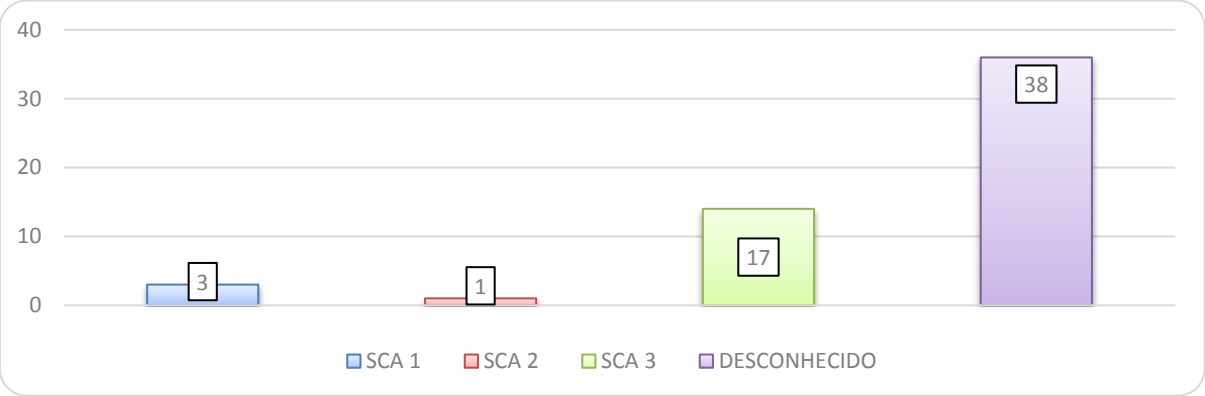

Gráfico 1: Distribuição dos pacientes com analise molecular para SCAs.

Nos 21 pacientes com resultados positivos para uma das SCAs analisadas, o número de repetições CAG foi inversamente proporcional à idade de início dos sintomas (p=0,0032; ANOVA), de acordo com o gráfico 2.

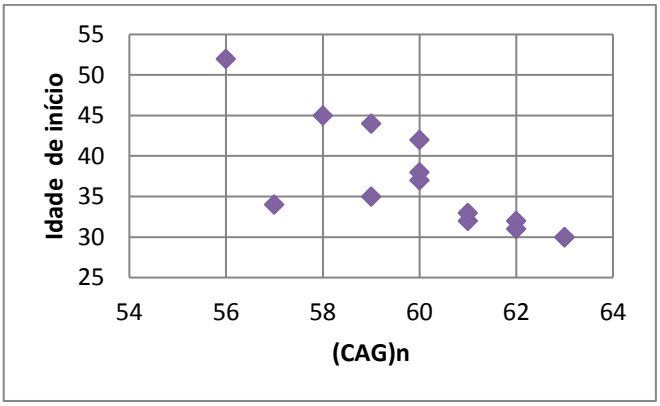

Gráfico 2: Correlação entre idade de início da doença com (CAG)n em pacientes diagnosticados.

DISCUSSÃO

Os resultados do estudo epidemiológico mostraram que a maioria das SCA encontradas são SCA3/DMJ, indicando que há a possibilidade de uma influência da colonização açoriana na Região Norte (15).

O estudo também revelou a idade de início dos sintomas de 30 anos, considerada uma idade comum para o início da doença (16). A relação do número de repetições trinucleodícicas CAG com a idade de início dos sintomas foi significativa pela análise de variância. O maior número de repetições está associado à produção de uma proteína mutante que acumulará grandes quantidades de resíduos de poliglutamina no núcleo do neurônio motor, em um intervalo de tempo reduzido. Desta forma, os sintomas podem se manifestar mais precocemente, caracterizando o fenômeno da antecipação (2).

Nos indivíduos que não tiveram histórico familiar consistente com herança autossômica domimante, deve-se levar em consideração que em alguns casos, a história da herança dominante fica oculta. Essa situação se dá nos casos de expressividade variável, de penetrância incompleta e de uma mutação *de novo*. Por exemplo, a morte precoce do genitor afetado, antes do aparecimento dos seus sintomas, pode evitar o conhecimento da condição familiar, fazendo com que a história da herança vertical fique perdida. Nesse contexto, devido a novas mutações ou à penetrância reduzida, alguns indivíduos podem se apresentar como casos isolados. É por isso que, também nos casos isolados, investigam-se as formas dominantes das ataxias hereditárias (23).

A implantação do diagnóstico molecular para SCAs é considerado o “padrão ouro” por ser definitivo independente do aparecimento dos sintomas (2). O uso do MLPA e da eletroforese capilar mostrou ser viável por ser rápido e prático, usando somente duas reações para oito tipos de SCA. Além de definir as expansões, através do software utilizado, foi possível obter o número de repetições nos alelos amplificados (17).

Ao ser confirmado o diagnóstico SCA, é imprescindível que seja informado ao paciente ou demais familiares sobre a natureza hereditária e os riscos impostos a todos relacionados. Este processo se dá através do Aconselhamento Genético, onde

caberá ao médico encaminhar o paciente ao serviço, e que em geral, é realizado por geneticistas clínicos. Ao receber as informações sobre a herança e sobre o prognóstico de sua doença, o indivíduo pode tomar as decisões que julgar melhores sobre o seu planejamento familiar, por exemplo, sobre ter ou não filhos biológicos, bem como sobre si mesmo, possibilitando escolhas profissionais, busca por seguridade social, tipo de moradia e facilidades na casa que mais lhe convêm.

Outro ponto importante são os aspectos éticos envolvendo testes preditivos para detecção de indivíduos maiores de idade e assintomáticos que queiram descobrir se são afetados por estas doenças. É necessário que o consulente seja orientado por profissional da área da saúde habilitado, apto a transmitir-lhe as informações pertinentes ao exame e suas implicações, para que a decisão de fazer o teste preditivo seja consciente, levando-se em consideração seus aspectos positivos e negativos (24).

CONCLUSÃO

Após traçado o perfil clínico e epidemiológico dos 59 indivíduos analisados, constatou-se a média de idade de 34 anos (DP=14,8) e a idade média do aparecimento dos sintomas aos 30 anos (DP=14,3). Destes, apenas 22 indivíduos apresentam histórico familiar compatível com padrão de herança autossômica dominante.

Todos os pacientes apresentaram como principal sintoma clínico a ataxia. Dentre os outros sintomas, os mais comuns foram a disfagia/disartria, alterações de neurocondução e rigidez.

Destes 54 pacientes, 21 apresentaram diagnóstico para uma das SCAs investigadas, e o número de repetições CAG foi inversamente proporcional à idade de início dos sintomas (p=0,0032; ANOVA).

Dessa forma é possível diagnosticar indivíduos com sintomas que indicam esses tipos de doenças, ajudar as famílias através do aconselhamento genético e do diagnóstico precoce, assim como iniciar novos estudos destas doenças na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bird, TD: Ataxia overview. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle, updated 07/25/00, www.geneclinics.org/profiles/ataxias.

2. Castilhos, RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, Pedroso JL, Salarini DZ, Vargas FR, Lima Ma, Godeiro C, Santana-Da-Silva LC, Toralles MB, Santos S, Van Der Linden H Jr, Wanderley HY, De Medeiros PF, Pereira ET, Ribeiro E, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB; Spinocerebellar Ataxias in Brazil—Frequencies and Modulating Effects of Related Genes. Cerebellum 2013; DOI 10.1007/s12311-013-0510-y.

3. Subramony, SH, McDaniel DO, Smith S, Vig PJS: Spinocerebellarataxia type 3. GeneClinics: Clinical GenetiInformation Resource [database online]. University of Washington, Seattle.

4. Sequeiros, J; Martins, S; Silveira I. Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias. Handb Clin Neurol. 2012;103:227–51.

5. Trott A, Jardim LB, Ludwig HT, et al., Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. Clin Genet. 2006;70(2):173–6.

6. Ranum LPW, Chung MY, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, et al., Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type I: evidence for familial effects on the age at onset. Am J Hum Genet. 1994;55(2):244–52.

7. DeStefano AL, Cupples LA,Maciel P,Gaspar C, Radvany J,Dawso DM, Sudarsky L, Corwin L, Coutinho P, MacLeod P, Sequeiros J, RouleauGA, Farrer LA.A familial factor independent of CAGrepeat length influences age at onset ofMachado-Joseph disease.AmJHum Genet. 1996; 59(1):119–127.

8. Pulst SM, Santos N,Wang D, Yang H, Huynh D, et al., Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. Brain. 2005;128:2297–303.

9. Jardim L, Silveira I, Pereira ML, et al., Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado- Joseph disease (SCA3) phenotype. Acta Neurol Scand. 2003;107(3):211–4.

10. Bettencourt C, Raposo M, Kazachkova N, Cymbron T, Santos C, Kay T, et al., The APOE ε2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. Arch Neurol. 2011;68(12):1580–3.

11. Emmel VE, Alonso I, Jardim LB, Saraiva-Pereira ML, Sequeiros J. Does DNA methylation in the promoter region of the ATXN3 gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients? Clin Genet. 2011;79(1):100–2.

12. BRAND V, Zoghbi HY: Spinocerebellar ataxia type 1. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle, updated 01/26/01, www.geneclinics.org/profiles/sca1

13. Orr HT: The ins and outs of a polyglutamine neurodegenerative disease: spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). Neurobiol Dis 2000,7:129–134

14. Pulst S-M: Spinocerebellar ataxia type 2. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle, updated 01/19/01, www.geneclinics.org/profiles/sca2

15. Subramony SH, McDaniel DO, Smith S, Vig PJS: Spinocerebellar ataxia type 3. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle

16. Van Alfen N, Sinke RJ, Zwarts MJ, Gabreels-Festen A, Praamstra P,Kremer BP, Horstink MW: Intermediate CAG-repeat lengt for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. Ann Neurol 2001, 49:805–807

17. Gomez CM: Spinocerebellar ataxia type 6. GeneClinics: Clinical Genetic Information Resource [database online]. University of Washington, Seattle, updated 07/24/00, www.geneclinics.org/profiles/sca6

18. Cagnoli C, Michielotto C, Matsuura T, Ashizawa T, Margolis RL, Holmes SE, et al..,. Detection of large pathogenic expansions in FRDA1, SCA10, and SCA12 genes using a simple fluorescent repeat-primed PCR assay. J Mol Diagn. 2004;6(2):96–100.

19. Andrés AM, Lao O, Soldevila M, Calafell F, Bertranpetit J. Dynamics of CAG repeat loci revealed by the analysis of their variability. Hum Mutat. 2002;21:61–70.

20. Filla A, Mariotti C, Caruso G, et al., Relative frequencies of CAG expansions in spinocerebellar ataxia and dentatorubropallidoluysian atrophy in 116 Italian families. Eur Neurol. 2000;44(1):31–6.

21. Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

22. Rusu C, Sireteanu A, Puiu M, Skrypnyk C, Tomescu E, Csep K, Creţ V, Barbarii L. [MLPA technique--principles and use in practice]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2007 Oct-Dec;111(4):1001-4.

23. Jardim LB, Saute JAM. Ataxias Hereditárias. In: Márcia L. F. Chaves; Alessandro Finkelsztejn. *Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia.*Porto Alegre, Artmed. 2008.cap.26. 363-380p.

24. Rodrigues CSM. Testes preditivos para doenças neurogenéticas, o perfil dos candidatos no sul do Brasil. Dissertação de mestrado. Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

3. Considerações finais

Acredita-se que futuramente, através dos resultados obtidos pelas pesquisas, seja possível aumentar as perspectivas em termos de diagnósticos para os diferentes tipos de ataxias, junto a tratamentos mais eficazes. Desta forma, sugere-se a busca de outros genes candidatos, assim como biomarcadores que estejam envolvidos com estas doenças. Além de estudos que possam gerar uma maior ou total compreensão sobre os mecanismos fisiopatológicos das diversas SCAs, sendo necessárias mais pesquisas moleculares, epidemiológicas e clínicas na população brasileira.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Albano LMJ. Genética clínica e molecular das doenças neurológicas com mutações dinâmicas. 1a ed. 2000;97-140

2. Bird TD. Hereditary Ataxia Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews®[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. 1998 Oct 28 [updated 2016 Nov 3].

3. Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. Arch Neurol 2004;61:727-733.

4. Castilhos RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, Pedroso JL, Salarini DZ, Vargas FR, Lima Ma, Godeiro C, Santana-Da-Silva LC, Toralles MB, Santos S, Van Der Linden H Jr, Wanderley HY, De Medeiros PF, Pereira ET, Ribeiro E, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB; Spinocerebellar Ataxias in Brazil—Frequencies and Modulating Effects of Related Genes. Cerebellum 2013; DOI 10.1007/s12311-013-0510-y.

5. Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984, 266p.

6. Harding, AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. Lancet 1983;1151-1155.

7. Jardim LB, Saute JAM. Ataxias Hereditárias. In: Márcia L. F. Chaves; Alessandro Finkelsztejn. *Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia.*Porto Alegre, Artmed. 2008.cap.26. 363-380p.

8. Jardim LB, Silveira I, Pereira Ml. A survey of spinocerebellar ataxia in south Brazil-66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA 7, SCA 8, or unidentified disease-causing mutations. J Neurol 2001;248:870-876.
9. Paulson HL, SUBRAMONY SH. Ataxia: The whats and hows of acquired and genetic disease. American Academy of Neurology, Education Program Syllabus, Denver, 2002.

10. Paulson HL. Dominantly Inherited Ataxias: Lessons Learned from Machado-Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia Type 3. Seminars in Neurology 2007;27:133-42.

11. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. Neuroepidemiology. 2014;42:174–83.

12. SOONG BW, PAULSON HL. Spinocerebellar ataxias: an update.Curr Opin Neurol. 2007;20:438-446 Syllabus, Denver, 2002.

13. Trott A, Jardim LB, Ludwig HT, Saute JAM, Artigalas O, Kieling C, et al. Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. Clin Genet 2006;70:173-6.

14. Trott A, Maris AF, De Miranda GB. Spinocerebellar ataxias caused by expanded polyglutamine: A review | Ataxias espinocerebelares causadas por expansão de poliglutamina: Uma revisão *Revista Neurociencias*. 18: 512-522.

15. Warrick J, Paulson H, Gray-Board G, Bui Q, Fischbeck K, Pittman R, et al. Expanded Polyglutamine Protein Forms Nuclear Inclusions and Causes Neural Degeneration in Drosophila. Cell 1998;93:939-49.

5. ANEXO

Normas da revista:

SUBMISSION OF PAPERS

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage http://www.gmb.org.br.

1.Manuscripts must be submitted through our online submission platform hosted at:https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo

The cover letter should be addressed to:

Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

- The manuscript must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file. Furthermore, a cover letter addressed to the Editor is required. It must be edited by the corresponding author inserted within the reserved data field.
- Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the

submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed.

- The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and not-preferred reviewer(s).
- Files must be uploaded separately and identified according to file types. The main text file must include references and, if applicaple, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.h).
- Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b)**The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c)**The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and useet al.,List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them

chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al..,., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al., should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine.Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction- Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods- Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results- Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only P-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion -The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al..,. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes ofRhynchosciara angelae at different stages of larval development. Chromosoma 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The

X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in Calyptommatus and the karyotypes of Psilophtalmus and Tretioscincus (Squamata, Gymnophthalmidae). Genet Mol Biol 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. PLoS One 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM),(September 4, 2009)

LEM Software, September 4, 2009)

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

l) **Nomenclature:**Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l)**Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table

S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

Table S1 – < short title >

Figure S1 – < short title >

This material is available as part of the online article from

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

3.3 Genome Insight For GMB

A new section of articles devoted to genome data (Genome Insight) will be considered for publication in Genetics and Molecular Biology. Genome Insight is for focused papers, usually of approximately 1500 words (up to four tables or figures), that publish new genome data as they become submitted to GenBank. This section is the premier forum to deliver that information directly to the genome community in a rapid and efficient publication of the genome. Data must be related to a complete (or nearly complete) and fully annotated genome for prokaryote or viruses, but a draft may be accepted for an eukaryote genome. While the focus of Genome Insight is necessarily involved in novel sequences, the manuscript must contain specifically novel biological, evolutive, biotechnological and/or metabolic insights revealed by data. The work may provide comparative analyses of previously published genomes that contain a substantial and novel insight of broadest biological and genetic significance. Submitted manuscript must contain an abstract, which should be a brief report on the organism as well as its relevance and the main insight revealed by the genome. The text (approximately 1500 words-excluding abstract, references and acknowledgements) should not contain subdivisions, but must contain the rational for the selection of such organism as well as organism information (including taxonomy, natural habitat, phylogenetic position, eventual pathogenicity, symbiotic, biotechnological use, etc), methodology (genome sequencing and assembly; reference number at GenBank), genome relevance (which should indicate the main insights revealed by the data analysis and main conclusions. Acknowledgements and References (up to 20 references) headings should be included. Figure Legends should be provided at the end of the manuscript. Metagenome, transcriptome as well as epigenome data may also be considered for publication, but prior submission of the abstract to the

Editor is necessary. Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see item 3.1.m. in our Instructions to Authors.

3.4 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.5 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

3.6 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.7 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding

author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding other. The latter will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by fax to the Editorial Office.

5.Reprints

Reprints are free of charge and will be provided as a pdf-file.