

Universidade Unigranrio Afya

Curso de Biomedicina

CAROLINE ESPÍRITO SANTO MOREIRA MAGALHÃES

**RASTREAMENTO DA EXPANSÃO DE POLIGLUTAMINA NO GENE *ATXN2*
ASSOCIADA À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) NO RIO DE
JANEIRO UTILIZANDO ANÁLISE DE FRAGMENTOS**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade Unigranrio Afya

Curso de Biomedicina

CAROLINE ESPÍRITO SANTO MOREIRA MAGALHÃES

**RASTREAMENTO DA EXPANSÃO DE POLIGLUTAMINA NO GENE *ATXN2*
ASSOCIADOS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) NO RIO DE
JANEIRO UTILIZANDO ANÁLISE DE FRAGMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade do Grande Rio “Prof. José de
Souza Herdy”, como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadores: Dra. Rosalia Mendez Otero

Dr. Alison Henrique Ferreira Julio

RIO DE JANEIRO

2025

CAROLINE ESPÍRITO SANTO MOREIRA MAGALHÃES

RASTREAMENTO DA EXPANSÃO DE POLIGLUTAMINA NO GENE *ATXN2*
ASSOCIADOS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) NO RIO DE
JANEIRO UTILIZANDO ANÁLISE DE FRAGMENTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade do Grande Rio "Prof. José de
Souza Herdy", como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadores: Dra. Rosalia Mendez Otero

Dr. Alison Henrique Ferreira Julio

Aprovada em:

Duque de Caxias, 26 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



ROSALIA MENDEZ OTERO

Data: 27/11/2025 17:40:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Rosalia Mendez Otero

Maria Luciana S. de Freitas

Dra. Maria Luciana Silva de Freitas

IGOR F. C. ALMEIDA

Dr. Igor Ferreira da Costa de Almeida

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer às mulheres que sempre estiveram presentes na minha vida.

Primeiro, à minha falecida vovó Suzi, que mal sabia ler ou escrever o próprio nome, mas me ensinou, com a força silenciosa de quem sobreviveu a muito, que estudar é um privilégio e um caminho. Ela queria ter tido essa chance, e eu caminho por ela. E agradeço por me fazer sentir tão à vontade dentro da minha própria personalidade, tão parecida com a dela.

À minha tia Lúcia, que me mostrou, sem rodeios, a força da independência feminina.

À minha mãe, professora, que sempre repetiu, e provou, que educação transforma vidas, abre portas e descobre mundos. Ela me ensinou que a curiosidade é um motor, que o conhecimento é uma bússola e que sonhar não é exagero, é necessidade.

À minha tia Marta, que foi abrigo quando a vida virou tempestade. Que faz o impossível parecer administrável. Ela cuidou do que eu não tinha forças pra cuidar, carregou junto comigo dores que eu não sabia onde colocar e segurou minha mão quando o mundo parecia grande demais.

A todas elas, que me ensinaram a valorizar o trabalho, mas também o propósito; a força, mas também a leveza; o caminho, mas também o porquê dele.

Às minhas três irmãs da vida, Carla de Jesus, Carla Cristina e Natalia Sancho, meu trio de apoio constante, minha família escolhida, que celebrou cada vitória e me segurou em cada queda.

Às minhas amigas da faculdade que transformaram a trajetória em algo mais leve, divertido e humano. O caminho científico não precisa ser árduo o tempo inteiro: a leveza também sustenta.

À minha orientadora, Dra. Rosalia Mendez-Otero, pela oportunidade de iniciar minha carreira científica em seu Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular (LNCM), pela confiança e pelo incentivo que mudaram o rumo da minha formação.

E, ao ponto fora da curva, o único homem dessa lista, meu coorientador, Dr. Alison Julio, pela atenção, disponibilidade e pelo suporte essencial à minha formação. Sua postura cuidadosa e seu comprometimento com o meu avanço científico, juntamente com a Dra. Rosalia, que foram decisivos para que este trabalho fosse possível.

“Eu venho como uma, mas estou aqui como dez mil.”

— *Maya Angelou*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Foto do gel de agarose na 1ª etapa e na 2ª etapa da RP-PCR.....	22
FIGURA 2 – Eletroferograma do doador controle 1 obtido por análise de fragmentos	23
FIGURA 3 – Eletroferograma do doador controle 2 obtido por análise de fragmentos.....	24
FIGURA 4 – Eletroferograma do Controle Positivo (ELA1 - ALS3/12) obtido por análise de fragmentos.....	25
FIGURA 5 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA12 - ALS105/16) obtido por análise de fragmentos.....	26
FIGURA 6 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA40 - ALS130/16) obtido por análise de fragmentos.....	27
FIGURA 7 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA41 - ALS135/16) obtido por análise de fragmentos.....	28
FIGURA 8 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA18 - ALS111/16) obtido por análise de fragmentos.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Primers utilizados para amplificação das regiões de interesse do gene *ATXN2*....17

TABELA 2 – Dados das amostras e seus respectivos cálculos para identificar as repetições.....21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. METODOLOGIA.....	16
2.1. TIPO DE ESTUDO	16
2.2. FORMULAÇÃO DOS PRIMERS PARA AMPLIFICAR AS REGIÕES DE INTERESSE NO GENE ATXN2.....	16
2.3. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE DOADORES SAUDÁVEIS E PACIENTES COM ELA.....	17
2.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	18
2.5. AMPLIFICAÇÃO POR RP-PCR (REPEAT-PRIMED PCR) E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	18
2.6. ANÁLISE DE FRAGMENTOS	19
3. RESULTADOS	21
3.1. AMPLIFICAÇÃO POR RP-PCR (REPEAT-PRIMED PCR) E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	21
3.2. ANÁLISE DE FRAGMENTOS	22
4. DISCUSSÃO	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
6. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	36

RASTREAMENTO DA EXPANSÃO DE POLIGLUTAMINA NO GENE *ATXN2* ASSOCIADOS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) NO RIO DE JANEIRO UTILIZANDO ANÁLISE DE FRAGMENTOS

Caroline Espírito Santo Moreira Magalhães¹

Rosalia Mendez Otero²

Alison Henrique Ferreira Julio³

RESUMO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva rara e sem cura, associadas a aproximadamente 50 genes, entre eles expansões de repetições no gene Ataxina 2 (*ATXN2*). Este trabalho teve como objetivo padronizar o rastreamento das expansões associadas a *ATXN2* por tecnologia de análise de fragmentos, em amostras celulares de pacientes com ELA no estado do Rio de Janeiro. Para isso, amostras de PBMCs (*Células Mononucleares do Sangue Periférico*) e iPSCs (*Células-Tronco Pluripotentes Induzidas*) derivadas de uma coorte de pacientes com ELA e de doadores saudáveis foram analisadas empregando-se as técnicas de RP-PCR (Repeat-Primed PCR) seguida de eletroforese capilar para conduzir análise de fragmentos. Foi possível padronizar e otimizar o setup para análise de fragmentos de PolyQ em *ATXN2* de forma consistente e com alta reprodutibilidade entre os ensaios conduzidos. Após padronizar o ensaio, iniciamos o rastreamento em baixa escala usando oito amostras com pacientes de ELA, detectamos expansão em heterozigose para este paciente. Curiosamente, uma das amostras avaliadas não possuiu variantes associadas a ELA em *TARDBP*, *VAPB*, *FUS*, *SOD1*, *SMN1* e *SMN2*, sugerindo que a ELA neste paciente pode estar associada a expansão que detectamos. Embora de forma preliminar, estes resultados em baixa escala demonstram a aplicabilidade da técnica, reforçando a utilidade dela para um possível rastreio molecular da ELA. Como perspectiva, esperamos aplicar em larga escala a abordagem padronizada e otimizada neste estudo buscando conduzir a triagem genética para ajudar na compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na ELA com foco na população do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica, *ATXN2*, RP-PCR, análise de fragmentos.

¹Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

²Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

³Doutor em Ciências Morfológicas pela Universidade do Rio de Janeiro – UFRJ.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rare, progressive, and incurable neurodegenerative disease associated with approximately 50 genes, including repeat expansions in the Ataxin 2 (*ATXN2*) gene. This work aimed to standardize the screening of expansions associated with *ATXN2* using fragment analysis technology in cellular samples from ALS patients in the state of Rio de Janeiro. For this purpose, PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) and iPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells) derived from a cohort of ALS patients and healthy donors were analyzed using RP-PCR (Repeat-Primed PCR), followed by capillary electrophoresis to perform fragment analysis. It was possible to standardize and optimize the setup for consistent fragment analysis of PolyQ in *ATXN2* with high reproducibility between the conducted assays. After standardizing the assay, we initiated small-scale screening using eight samples from ALS patients, and we detected a heterozygous expansion in one patient. Interestingly, one of the evaluated samples did not present ALS-associated variants in *TARDBP*, *VAPB*, *FUS*, *SOD1*, *SMN1*, or *SMN2*, suggesting that ALS in this patient may be associated with the expansion we detected. Although preliminary, these small-scale results demonstrate the applicability of the technique, reinforcing its usefulness for potential molecular screening of ALS. As a future perspective, we aim to apply the standardized and optimized approach on a large scale, seeking to conduct genetic screening to help understand the genetic mechanisms involved in ALS, focusing on the population of Rio de Janeiro.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, *ATXN2*, RP-PCR, fragment analysis.

1. INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença rara degenerativa neuronal que acomete o cérebro, mais especificamente a região do córtex motor, e a medula espinhal. Essa degeneração resulta no enfraquecimento muscular progressivo, apresentando sintomas como disfagia, disartria, paralisia dos membros superiores e inferiores, além de alterações cognitivas, como o afeto pseudobulbar, uma condição neurológica que causa episódios repentinos de riso ou choro incontrolláveis e desproporcionais (VAN DER ENDE et al., 2021; GREENBERG; AMINOFF; SIMON, 2014). A progressão da doença costuma ser lenta, e a sobrevida média após o início dos sintomas varia entre 3 e 5 anos, sendo a paralisia respiratória a principal causa de óbito (BROWN & AL-CHALABI, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, para uma doença ser considerada rara é quando ela afeta até 1 em cada 2.000 pessoas na população geral, o que corresponde a até 50 casos por 100.000 habitantes (OMS, 2025). A ELA se enquadra nessa definição, apresentando uma prevalência média global entre 4 a 6 casos por 100.000 habitantes, com variações regionais significativas, e uma incidência entre 1 a 3 por 100.000 pessoas-ano (WOLFSON et al., 2023), o que reforça sua classificação como doença rara. Embora haja divergência entre estudos quanto à evolução da taxa de incidência ao longo do tempo, com alguns indicando estabilidade e outros sugerindo um aumento, há um consenso de que a ocorrência da doença tende a crescer, influenciada pelo envelhecimento populacional e pelos avanços terapêuticos que prolongam a sobrevida dos pacientes (WOLFSON et al., 2023).

A incidência da ELA aumenta progressivamente com a idade, atingindo seu pico entre os 60 e 79 anos. A idade média de início dos sintomas é por volta dos 50 anos, embora casos possam ocorrer entre os 20 e 90 anos (VAN DER ENDE et al., 2021). No Brasil, estima-se que a incidência é semelhante a observada em outros países na América Latina (MOURA; CASULARI; CARVALHO, 2016). No entanto, ainda não há um levantamento epidemiológico a nível nacional que permita estimar a prevalência da doença no Brasil, podendo tanto encobrir um número maior de casos quanto resultar em subnotificações. A doença apresenta maior prevalência em indivíduos da etnia caucasiana, especialmente em populações de origem europeia. Além disso, estudos indicam que indivíduos do sexo masculino possuem risco entre

1,3 a 1,56 vezes maior de desenvolver ELA em comparação ao sexo feminino (MEHTA et al., 2023; CHUGH, 2019).

A ELA possui duas formas principais: a familiar, (do inglês *fALS*, *familial Amyotrophic Lateral Sclerosis*) quando há herança genética definida, ou esporádica (do inglês *sALS*, *sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis*) quando não existe um padrão claro de transmissão entre gerações. No entanto, mesmo os casos com ausência de histórico familiar, não exclui a influência genética uma base genética haja vista que muitos casos classificados como esporádicos ainda carregam variantes que contribuem para o desenvolvimento da doença. A etiologia da sALS permanece não totalmente compreendida, mas as evidências apontam para um modelo multifatorial, resultante da interação entre predisposições genéticas e fatores ambientais, como exposição ocupacional a solventes orgânicos, pesticidas e metais pesados. A forma esporádica corresponde a aproximadamente 90% a 95% dos casos, enquanto a forma familiar representa cerca de 5% a 10% (RIZEA et al., 2024; BRADLEY et al., 2018).

Existem diversos fatores que tornam particularmente relevante o estudo epidemiológico da ELA no contexto brasileiro. Um deles é o aumento contínuo da expectativa de vida da população. De acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022), o número de pessoas com 65 anos ou mais cresceu 57,4% em apenas 12 anos, passando a representar 15,6% da população nacional. Fatores como melhor qualidade de vida, melhora no saneamento básico e na alimentação têm contribuído para o aumento da longevidade (MARZO et al., 2023). Além disso, outro aspecto importante é a composição genética da população brasileira. Apesar da grande diversidade étnica, estudos apontam predominância significativa de ancestralidade europeia em todas as regiões do país, estimada em cerca de 60%, com maior concentração nas regiões Sul e Sudeste (NUNES et al., 2025). Essa informação é relevante, considerando que a ELA apresenta forte associação com indivíduos de ascendência europeia e maior prevalência em populações de ascendência europeia (WOLFSON et al., 2023). Portanto, desconsiderar esse aspecto pode levar a uma interpretação imprecisa sobre o real grau de vulnerabilidade da população brasileira à ELA.

Essa dificuldade para compreender sobre a real dimensão da doença no território brasileiro, e, considerando que o país também está passando por um

processo acelerado de envelhecimento populacional (IBGE, 2022), é urgente ampliar as investigações nacionais a respeito dessa enfermidade. Mesmo sem cura, a abordagem preventiva em ELA envolve diagnóstico precoce e melhor organização dos serviços especializados, o que permite planejar o Sistema Único de Saúde (SUS), antecipando demandas e reduzindo futuros impactos no SUS. Para o paciente, esses avanços significam um acesso mais rápido ao diagnóstico, agilidade para o início do cuidado multidisciplinar, essencial diante da rápida progressão da ELA, além de melhoria na qualidade de vida, redução de complicações e tempo ampliado para planejamento pessoal e familiar. Considerando que os primeiros sintomas da ELA manifestam-se na terceira idade, torna-se essencial um diagnóstico precoce e preciso.

Entretanto, devido à ausência de exames específicos, a doença continua sendo diagnosticada tardiamente, pois por ser uma doença rara, e por possuir sintomas semelhantes a outras doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson (DP), Demência Frontotemporal (DFT) e Doença de Huntington (DH) (BORGHETTI et al., 2022), não é uma das primeiras opções clínicas para a averiguação, o que compromete o prognóstico do paciente diante da sua sobrevida reduzida entre 3 e 5 anos (MOTATAIANU et al., 2025; DA COSTA et al., 2024; KJÆLDGAARD et al., 2021). Dessa forma, torna-se urgente a implementação de métodos de diagnóstico precisos e ágeis. Entre as alternativas disponíveis, destaca-se o diagnóstico molecular (VAN DER ENDE et al., 2021). Nesse contexto, a realização de estudos que investiguem os fatores genéticos associados à ELA, considerando a diversidade e as particularidades do genoma brasileiro, torna-se essencial. A ampliação do conhecimento acerca desses marcadores genéticos pode contribuir não apenas para o diagnóstico precoce da doença, mas também para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e adequadas à realidade populacional e genética do país.

Sabe-se que a ELA possui a interferência de variantes gênicas, seja de forma monogênica, seja de forma poligênica. Atualmente, cerca de 40 genes estão associados ao desenvolvimento da ELA, dentre os mais estudados, Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (*C9ORF72*, em inglês), Superóxido Dismutase 1 (*SOD1*, em inglês) e Fused in Sarcoma (*FUS*), genes aos quais estão sendo amplamente

estudados para averiguar sua influência sobre a fisiopatologia da doença (NIJS & VAN DAMME, 2024).

Um marcador patológico observado em aproximadamente 97% dos pacientes, independente da origem da doença, é a disfunção e agregação citoplasmática da proteína TDP-43 (do inglês, *TAR DNA Binding Protein 43kDa*). A TDP-43 é uma proteína essencial na regulação de processos celulares, como regulação da expressão gênica, splicing alternativo de RNA, transporte de RNA e formação de grânulos de estresse, além de participar de processos importantes para a função e sobrevivência celular, como a manutenção da homeostase mitocondrial e da regulação da autofagia (JO et al., 2020). Ela atua como uma proteína de ligação a RNA e DNA, por reconhecer sequências ricas em uracila-guanina (UG) e em timina-guanina (TG), respectivamente. Sua localização principal é no núcleo, mas também está presente no citoplasma e nas mitocôndrias, sendo essencial para a homeostase celular. No citoplasma, a TDP-43 participa de processos celulares como a regulação de grânulos de estresse, estabilidade e tradução de RNAm, além do tráfego de RNAm, microRNAs (miRNAs) da regulação da autofagia (JO et al., 2020). Em condições normais, TDP-43 é altamente regulada, e sua perda ou disfunção resulta em toxicidade e morte celular (MA et al., 2022; JO et al., 2020; SUK & ROUSSEAU, 2020; WANG et al., 2004).

O gene responsável por codificá-la é o *TARDBP* e estima-se que existam cerca de 50 variantes patogênicas associadas à ELA neste gene (JO et al., 2020).

Em pacientes com ELA, a TDP-43 apresenta acúmulo no citoplasma em forma de agregados, especialmente no córtex cerebral e na medula espinhal. Esses agregados contêm fragmentos truncados da proteína, resultantes de clivagem proteolítica, e sofrem modificações pós-traducionais, como fosforilação e ubiquitinação (SUK & ROUSSEAU, 2020). Além disso, esses agregados interagem com grânulos de estresse celular, o que compromete a dinâmica intracelular e contribui para a disfunção neuronal.

Essas alterações estão relacionadas à perda de função nuclear da TDP-43 e sugerem um possível ganho de função tóxica no citoplasma, embora esse mecanismo ainda não esteja totalmente elucidado. De forma geral, os efeitos dessas alterações incluem prejuízos no transporte axonal e no sistema de autofagia, levando à perda

progressiva de funções neurais e à neurodegeneração (MA et al., 2022; SUK & ROUSSEAU, 2020).

No entanto, considerando que a agregação pode representar um evento secundário, manifestando-se apenas em fases avançadas da patologia, as pesquisas atuais estão direcionadas a investigar os mecanismos iniciais responsáveis à disfunção da TDP-43 antes mesmo da formação dos agregados (SUK & ROUSSEAU, 2020). Nesse contexto, diferentes fatores genéticos têm sido associados à desregulação dessa proteína, destacando-se, entre eles, o gene *ATXN2*, cuja atuação na ELA envolve mecanismos potencialmente ligados à instabilidade e toxicidade do TDP-43 (ELDEN et al., 2010).

Antes da identificação da associação entre o gene Ataxina-2 (*ATXN2*) e ELA, ele era classicamente conhecido por seu envolvimento na atrofia espinocerebelar tipo 2 (SCA2), uma doença causada por expansões patogênicas do trinucleotídeo CAG no éxon 1. Nessa região, diferentes faixas de repetição definem fenótipos distintos: alelos considerados normais, amplamente predominantes na população geral, apresentam tipicamente 22 a 23 repetições CAG (LATTANTE et al., 2014). Valores mais elevados, classificados como expansões intermediárias, geralmente entre 27 e 33 repetições, não são suficientes para causar SCA2, mas representam uma categoria molecular distinta entre normalidade e patogenicidade (ELDEN et al., 2010). Por fim, expansões longas, acima de 34 CAG, são consideradas patogênicas e causadoras de SCA2 (PULST, 2025).

Foi justamente ao investigar essas faixas intermediárias que Elden e colaboradores (2010), identificaram que indivíduos portadores dessas expansões intermediárias de *ATXN2* apresentam maior risco para o desenvolvimento da ELA, indicando que o *ATXN2* atua como um importante fator genético modificador na doença. Essa região do gene, que codifica repetições do aminoácido glutamina, conhecido como polyQ (do inglês, *polyglutamine*, sendo a letra Q representando glutamina), parece modular vias celulares importantes para a vulnerabilidade neuronal, incluindo processos metabólicos, de estresse celular e regulação proteica (COSTA et al., 2024; VIEIRA DE SÁ et al., 2024). Evidências clínicas reforçam o impacto funcional dessas expansões: enquanto indivíduos saudáveis apresentam tipicamente entre 22 e 23 repetições, portadores de expansões intermediárias

apresentam uma maior probabilidade de desenvolver a ELA de forma mais precoce, com média de início aos 48 anos, em comparação com 59 anos em outros pacientes (VIEIRA DE SÁ et al., 2024).

A proteína ATXN2 exerce múltiplas funções, ainda não completamente elucidadas, participando de processos moleculares e celulares como estabilidade e tradução de RNA, regulação do metabolismo celular, formação de grânulos de estresse, endocitose e organização do citoesqueleto (COSTA et al., 2024; WANG et al., 2014). No entanto, as funções podem alterar a depender da estrutura, localização subcelular e modificações pós-traducionais (COSTA et al., 2024).

Sabe-se que ATXN2 e TDP-43 interagem fisiologicamente em neurônios da medula espinhal, participando da homeostase de RNA e da dinâmica normal dos grânulos de estresse (do inglês SGs, *stress granules*). No entanto, essa relação torna-se desregulada na presença de expansões intermediárias no gene *ATXN2*. Elden e colaboradores (2010) demonstraram que, embora ATXN2 permaneça predominantemente no citoplasma em condições fisiológicas, ela é recrutada para SGs durante situações de estresse celular, indicando sua participação na comunicação do núcleo com o citoplasma, enquanto TDP-43 permanece no núcleo em condições fisiológicas, podendo se reposicionar para SGs quando necessário. Nos neurônios portadores de expansões intermediárias em *ATXN2*, esse reposicionamento intensifica a afinidade entre ATXN2 e TDP-43, favorecem o acúmulo citoplasmático de ATXN2, o que, por sua vez, recruta TDP-43 para complexos dependentes de RNA, aumentando sua tendência à agregação (COSTA et al., 2024). Estudos mais recentes reforçam esse mecanismo, mostrando que a ATXN2 expandida desestabiliza os SGs e promove a formação de agregados citoplasmáticos de TDP-43, acompanhados de sua perda patológica de TDP-43 nuclear e consequente perda de função, transformando uma interação fisiológica em um processo tóxico, contribuindo diretamente para a neurodegeneração observada na ELA (ELDEN et al., 2010; COSTA et al., 2024; VIEIRA DE SÁ et al., 2024).

A Doença de Huntington (DH), causada por expansões instáveis de CAG no gene Huntingtina (*HTT*), representa um exemplo clássico do impacto fisiológico dessas sequências repetitivas em doenças neurodegenerativas. Nessa condição, as expansões podem aumentar progressivamente ao longo da vida, especialmente em

neurônios vulneráveis, ultrapassando 500 repetições CAG, o que intensifica a perda neuronal e ativa vias de morte celular (HANDSAKER et al., 2025). Como cada códon CAG codifica uma glutamina, essas expansões extremas resultam em longas caudas de poliglutamina que intensificam a toxicidade proteica, a perda neuronal e promovem degeneração neuronal (HANDSAKER et al., 2025). Além disso, a quantidade de repetições CAG em sangue periférico tem sido associada a biomarcadores de neurodegeneração, antes mesmo do surgimento de sintomas clínicos (SCAHILL et al., 2025), reforçando a relevância biológica dessas expansões na progressão da doença.

No Brasil, identificou-se que os alelos intermediários do gene *ATXN2*, entre 27 e 32 CAGs, estão associados a um risco aumentado de desenvolver ELA em pacientes brasileiros (TAVARES DE ANDRADE et al., 2018). Esse padrão também é observado em coortes europeias e norte-americanas, nas quais expansões intermediárias de *ATXN2* foram consistentemente associadas a maior susceptibilidade para a doença (WANG et al., 2014). Alguns estudos sugerem que essas expansões intermediárias estão presentes com maior frequência em casos de ELA associados à mutação em *C9ORF72* (c9ALS), o que pode indicar vias moleculares que se convergem na patogênese da doença (CIURA et al., 2016).

Embora estudos como os de SELIER et al. (2016) e BALENDRA et al. (2018) indiquem que a redução da expressão de *C9ORF72* potencializa a agregação tóxica da *ATXN2*, no presente trabalho o foco foi direcionado à caracterização das repetições CAG no gene *ATXN2* e sua instabilidade ao longo do tempo, independentemente da presença de outras mutações.

Essa evidência reforça que expansões CAG não apenas caracterizam doenças como DH, mas também apresentam comportamentos dinâmicos e potencialmente patológicos em outros genes, como *ATXN2*, justificando a importância de investigar a instabilidade dessas expansões ao longo do desenvolvimento e a progressão das doenças neurodegenerativas.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo rastrear expansões no gene *ATXN2* por meio da técnica de análise de fragmentos, utilizando DNA derivado de PBMCs e iPSCs. Espera-se que os resultados obtidos contribuam para o aprimoramento do diagnóstico precoce e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e adequadas à diversidade genética brasileira.

2. METODOLOGIA

2.1. TIPO DE ESTUDO

Este é um estudo experimental de caráter exploratório, realizado no Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular (LNCM) localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF – UFRJ), com foco no rastreamento de expansões de repetições no gene *ATXN2*, associado à Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

2.2. FORMULAÇÃO DOS PRIMERS PARA AMPLIFICAR AS REGIÕES DE INTERESSE NO GENE *ATXN2*

Os primers utilizados para a análise do gene *ATXN2* foram definidos a partir das sequências de referência disponibilizadas no banco de dados *Ensembl*, garantindo que o desenho se baseasse em regiões genômicas atualizadas e já descritas na literatura (Tabela 1). Os primers foram posicionados de forma a flanquear o trecho contendo as repetições CAG no exon 1, permitindo a amplificação precisa do alelo e posterior demarcação do número de repetições. Após o desenho inicial, cada par de primers foi verificado no software *SnapGene*, que permitiu confirmar o local exato de anelamento, o tamanho esperado do amplicon e a ausência de interações indesejadas, garantindo uma precisão de localização na amplificação da análise de fragmentos.

Além disso, um outro primer forward foi desenhado com uma cauda M13, que permite a ancoragem de um primer universal marcado com o fluoróforo 6-FAM, que é incorporado ao produto amplificado e detectado na eletroforese capilar, permitindo a leitura precisa do tamanho dos fragmentos e, consequentemente, do número de repetições CAG.

TABELA 1 – Primers utilizados para amplificação das regiões de interesse do gene *ATXN2* (Gene ID: 6311)

Gene			
Gene	ID	Forward	Reverse
<i>ATXN2</i>	6311	TGTAACGACGGCCAGTGGGCCCCTCACCA TGTCG	CGGGCTTGCGGACATTGG
<i>ATXN2</i>	6311	6-FAM-TGTAACGACGGCCAGT	CGGGCTTGCGGACATTGG

2.3. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE DOADORES SAUDÁVEIS E PACIENTES COM ELA

Para os experimentos *in vitro*, foram utilizadas amostras de DNA genômico provenientes de células-tronco pluripotentes induzidas (em inglês, *iPSCs*), obtidas a partir de sangue periférico de um paciente diagnosticado com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). As *iPSCs* (linhagem UFRJi007-A) pertencem ao Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular (IBCCF – UFRJ) e foram derivadas de eritroblastos expandidos, obtidos por separação de células mononucleares, e reprogramadas com o kit CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, contendo os fatores de transcrição OCT3/4, KLF4, SOX2 e cMYC, conforme descrito por *Gubert et al. (2019)*.

Além das *iPSCs* utilizadas nos experimentos *in vitro*, também foram incluídas na análise molecular oito amostras de DNA genômico provenientes de células mononucleares de sangue periférico (em inglês, *PBMCs*) de pacientes diagnosticados com ELA. Para garantir a autenticidade dos resultados obtidos na investigação das expansões do códon CAG no gene *ATXN2*, foram selecionados dois controles negativos, oriundos de doadores saudáveis, e um controle positivo, correspondente ao paciente previamente confirmado para ELA com expansão intermediária em *ATXN2*. Esses três controles são oriundos de linhagem *iPSC* (UFRJi007-A) que foi descrita no parágrafo anterior. As oito amostras restantes, provenientes de *PBMCs* de pacientes com ELA sem avaliação prévia de *ATXN2*, foram submetidas à análise de fragmentos com o objetivo de determinar a presença ou ausência de repetições intermediárias no gene, contribuindo para a caracterização genética dessa coorte e para a elucidação do papel dessas expansões na patogênese da doença.

Todos os procedimentos envolvendo material biológico humano foram conduzidos em conformidade com as diretrizes éticas estabelecidas pela Resolução CNS nº 466/2012. O projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), garantindo que a obtenção, manipulação e análise das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) fossem realizadas segundo as normas vigentes de biossegurança, confidencialidade e respeito aos participantes. Este estudo foi aprovado em novembro de 2016 sob o número de parecer 60531516.0.3001.5261-Modelagem In Vitro de Esclerose Lateral Amiotrófica Utilizando Células - Tronco de Pluripotência Induzida.

2.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico, tanto das amostras iPSCs quanto das amostras PBMCs, foi realizada usando #QIA51106 QIAAMP DNA BLOOD MINI KIT (250) (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo a descrição do fabricante. As extrações foram conduzidas de duas formas: parte das amostras foi processada de maneira semiautomatizada utilizando o sistema QIAcube® (QIAGEN, Hilden, Alemanha), enquanto a outra parte foi extraída manualmente empregando #QIA69504 DNEASY BLOOD & TISSUE (50) (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Essa abordagem híbrida assegurou a eficiência da purificação e a padronização da qualidade do material genético obtido.

Após a extração, a concentração do DNA foi determinada por fluorometria utilizando o equipamento Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Fisher Scientific), com o padrão Qubit® dsDNA BR (Broad Range), garantindo maior sensibilidade e precisão na quantificação. Essa etapa foi fundamental para a normalização das concentrações entre as amostras antes das etapas subsequentes de amplificação.

2.5. AMPLIFICAÇÃO POR RP-PCR (REPEAT-PRIMED PCR) E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a detecção de expansões repetitivas no gene *ATXN2*, utilizou-se a técnica de RP-PCR (do inglês, *Repeat-Primed Polymerase Chain Reaction*), que permite identificar os alelos expandidos, mesmo quando o número de repetições excede a capacidade de resolução de uma PCR convencional. A reação utiliza três primers: um

primer flanqueador (forward), que se anela fora da região repetitiva, um primer repetitivo (reverse), que se anela em múltiplos pontos ao longo da sequência CAG e um primer âncora contendo a cauda M13, que funciona como sítio universal para amplificação adicional, possibilitando a detecção fluorescente posterior na eletroforese capilar. Essa combinação de primers possibilita uma alta sensibilidade para diferenciar os alelos expandidos, visto que este arranjo gera a amplificação sucessiva de fragmentos de tamanhos progressivos, resultando no padrão escalonado característico observado na eletroforese capilar.

A RP-PCR funciona como um sistema rápido e sensível de triagem, capaz de identificar a presença de expansões patogênicas mesmo sem determinar o tamanho exato do alelo expandido. Embora o método detecte padrões correspondentes a cerca de até 60 repetições, ele qualifica com precisão amostras portadoras de expansões de grande porte e diferencia de indivíduos com alelos de tamanho normal (RENTON et al., 2011).

As reações para o gene *ATXN2*, foram preparadas de acordo com o protocolo padrão do kit FastStart™ 2x PCR Master (Sigma-Aldrich, Merck Life Science). O ciclo térmico foi ajustado baseando-se nas recomendações do fabricante, e as amplificações foram conduzidas no termociclador MyCycler Thermal Cycler System (Bio-Rad). Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose a 3% contendo brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular de resolução de 100 pbs, permitindo a estimativa do número de repetições.

2.6. ANÁLISE DE FRAGMENTOS

Os amplicons obtidos foram enviados à Plataforma de Sequenciamento de DNA (IBCCF – UFRJ) para a realização da análise de fragmentos por eletroforese capilar no analisador genético SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Essa técnica baseia-se na determinação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR por meio da comparação com um marcador de tamanho padrão (do inglês, size standard) de fluorescência conhecida. Os primers com cauda M13 utilizados durante a RP-PCR possuem marcadores fluorescentes, o que permite a detecção dos fragmentos no sistema de leitura do equipamento. As análises por RP-PCR foram conduzidas em duas etapas. A primeira etapa consistiu na amplificação inicial com o

conjunto completo de primers, gerando produtos de tamanhos progressivos que indicam a presença de repetições CAG. A segunda etapa, por sua vez, utilizou o produto da etapa anterior como molde para uma amplificação adicional com o primer M13 marcado, o que aumenta a sensibilidade do método e melhora a visualização das bandas no gel. Após a RP-PCR, os produtos são injetados no capilar, separados com base no padrão de deslocamento dos fragmentos no gel, que permite identificar diferenças no tamanho dos alelos e, assim que detectados pelo sistema óptico do sequenciador, gera-se eletroferogramas que permitem identificar e quantificar os fragmentos presentes (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014). As leituras obtidas permitiram identificar a presença e o padrão característico de expansões patológicas nas regiões repetitivas investigadas, confirmando os perfis amplificados para ambos os genes. A averiguação das análises após processamento na plataforma foi realizada através do software GeneMarker V.3.0.1 (SoftGenetics LLC). As amostras foram analisadas com base no Padrão Interno de Tamanho (do inglês, Internal Lane Standard) ILS500. O ILS funciona como uma referência que permite determinar com precisão o tamanho dos fragmentos de DNA presentes na amostra. Durante a eletroforese capilar, os fragmentos do ILS migram em velocidades previamente conhecidas, o que possibilita ao software GeneMarker converter cada pico detectado em um valor correspondente de pares de bases (pb). Dessa forma, é possível identificar com exatidão os tamanhos dos fragmentos de interesse.

Durante a análise dos eletroferogramas, considerou-se para cada amostra o pico maior intensidade, correspondente ao fragmento amplificado com maior eficiência e, portanto, ao alelo representativo detectado pelo ensaio. Picos adicionais de baixa intensidade podem surgir próximos ao sinal principal, que são eventos comuns na técnica e incluem, por exemplo, produtos stutter, artefatos gerados pela DNA polimerase durante a amplificação de regiões repetitivas. Esses picos secundários não representam alelos distintos, mas, interpretados apenas como padrões técnicos esperados, razão pela qual o pico de maior amplitude foi utilizado como referência para determinação do tamanho final do fragmento (Tabela 2).

TABELA 2 - Dados das amostras e seus respectivos cálculos para identificar as repetições

AMOSTRA	ÚLTIMO PICO DETECTADO (pb)	VALOR REAL SEM OS 79 NUCLEOTÍDEOS TOTAIS DO PRIMER FORWARD E REVERSE	QUANTIDADE APROXIMADA DE TRINUCLEOTÍDEOS
CTRL1	153	74	25
CTRL2	153	74	25
ELA1 (ALS3/12)	154	75	25
ELA12 (ALS105/16)	156	77	26
ELA18 (ALS111/16)	168	89	30
ELA32 (ALS124/16)	155	76	25
ELA34 (ALS126/16)	155	76	25
ELA37 (ALS129/16)	154	75	25
ELA40 (ALS130/16)	156	77	26
ELA41 (ALS135/16)	156	77	26
ELA44 (ALS143/16)	154	75	25

TABELA 2 - Dados coletados após a análise de fragmentos no GeneMarker

Para o cálculo do número de repetições CAG, utilizou-se o tamanho de fragmento correspondente ao pico principal. O procedimento consistiu em subtrair do tamanho total do fragmento o comprimento fixo dos primers forward e reverse utilizados na amplificação (um total de 79 nucleotídeos), e dividir o valor resultante por três, uma vez que cada repetição corresponde a um trinucleotídeo CAG. O quociente obtido representa o número estimado de repetições presentes no alelo analisado.

3. RESULTADOS

3.1. AMPLIFICAÇÃO POR RP-PCR (REPEAT-PRIMED PCR) E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Após a otimização das condições de amplificação, a RP-PCR foi aplicada ao conjunto final de amostras incluídas no estudo: ELA12, ELA18, ELA34, ELA37, ELA40, ELA41, ELA44, além dos controles biológicos Controle Neurotípico 2 e ELA1, que é o controle que, nos dados gerados por Conzendey (2015) apresenta ATXN2 expandido com, aproximadamente, 36 repetições quando analisado em PBMC. No gel da primeira etapa (Figura 1.A), todas as amostras apresentam bandas compatíveis com o esperado para RP-PCR, ainda que com baixa intensidade, como característico dessa fase inicial do método. Na segunda etapa (Figura 1.B), os perfis tornaram-se mais definidos, com bandas mais intensas, permitindo melhor distinção dos alelos. A amostra ELA18 exibiu uma dupla banda evidente, sugerindo a presença de dois alelos de tamanhos distintos. Os controles apresentaram amplificação consistente nas duas etapas da RP-PCR, permitindo sua inclusão nas análises subsequentes, particularmente robusto na análise de fragmentos.

Figura 1 – Imagens do gel de agarose na 1ª etapa (Figura 1.A) e na 2ª etapa (Figura 1.B) da RP-PCR

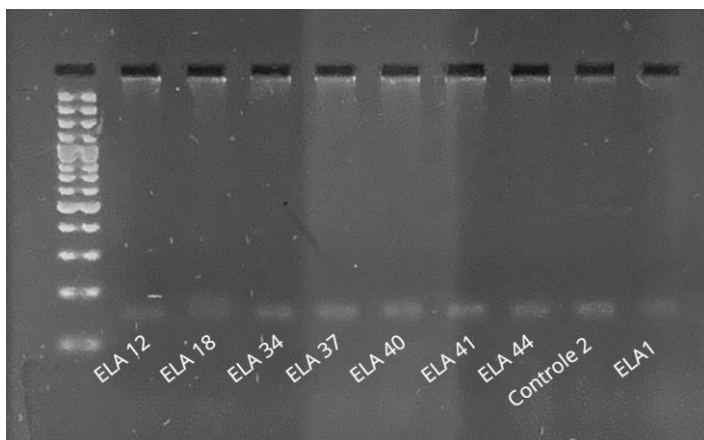


Figura 1.A

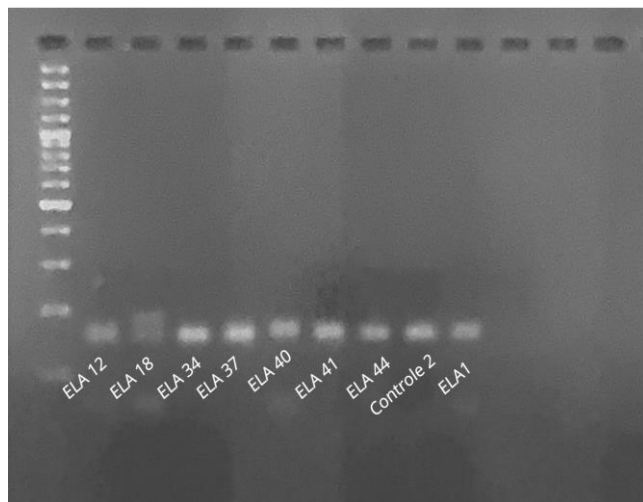


Figura 1.B

3.2. ANÁLISE DE FRAGMENTOS

Após uma triagem no biorepositório de amostras ELA do LNCM, foram selecionadas 11 amostras para a etapa de análise de fragmentos. Os critérios adotados nessa triagem incluíram: disponibilidade de DNA de boa qualidade e quantidade suficiente para todas as etapas experimentais, registros laboratoriais completos relacionados às análises prévias e, ausência de mutações detectáveis nos principais genes associados à ELA, conforme triagens anteriores realizadas pelo próprio LNCM, como *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP* e *FUS*. Esses critérios asseguraram um conjunto de amostras apropriado para investigar especificamente o status genético de *ATXN2*.

Foram incluídos dois controles neurotípicos, provenientes de doadores saudáveis, sem histórico clínico ou familiar de ELA. Ambos apresentaram perfis compatíveis com indivíduos neurotípicos, mostrando alelos dentro da faixa considerada normal, com 25 repetições CAG (Figuras 2 e 3).

FIGURA 2 – Eletroferograma do doador controle neurotípico 1 obtido por análise de fragmentos

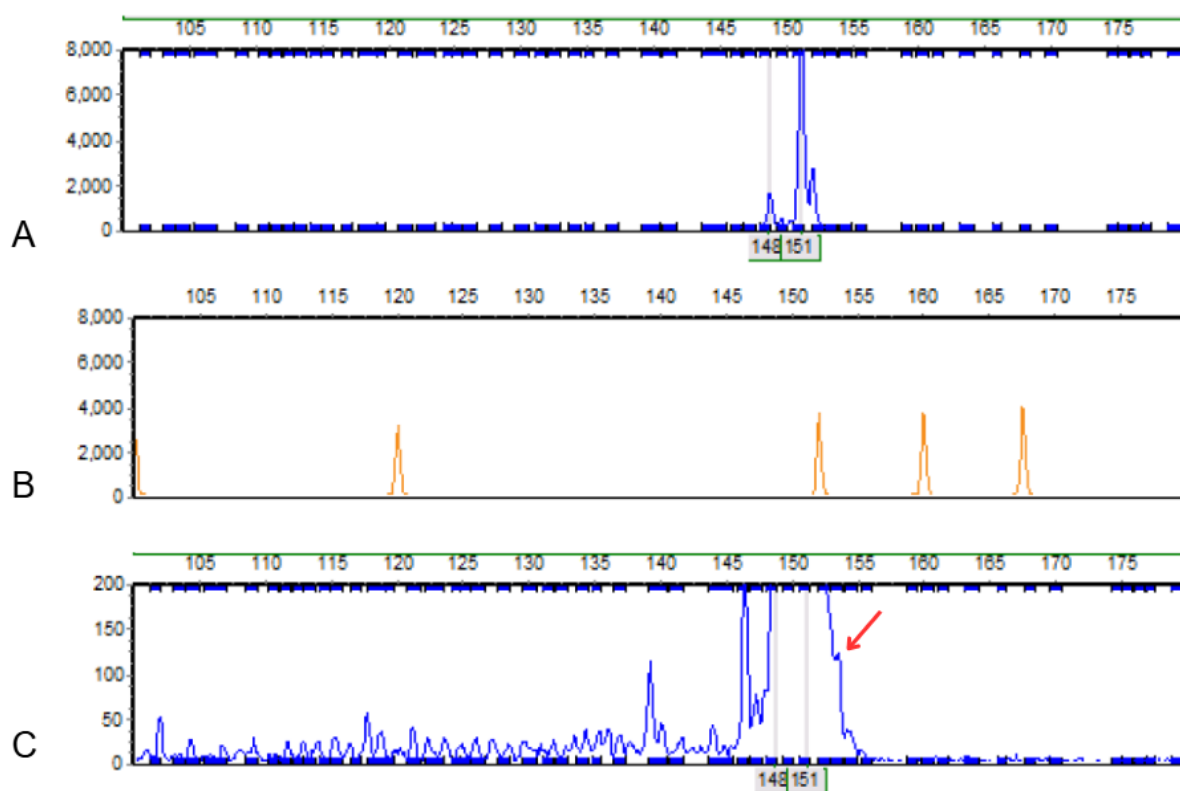


Figura 2. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A. Detecção das expansões de repetição CAG no controle 1, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 145 pb e 153 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizado como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle 1, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 153 pb.

FIGURA 3 – Eletroferograma do doador controle neurotípico 2 obtido por análise de fragmentos

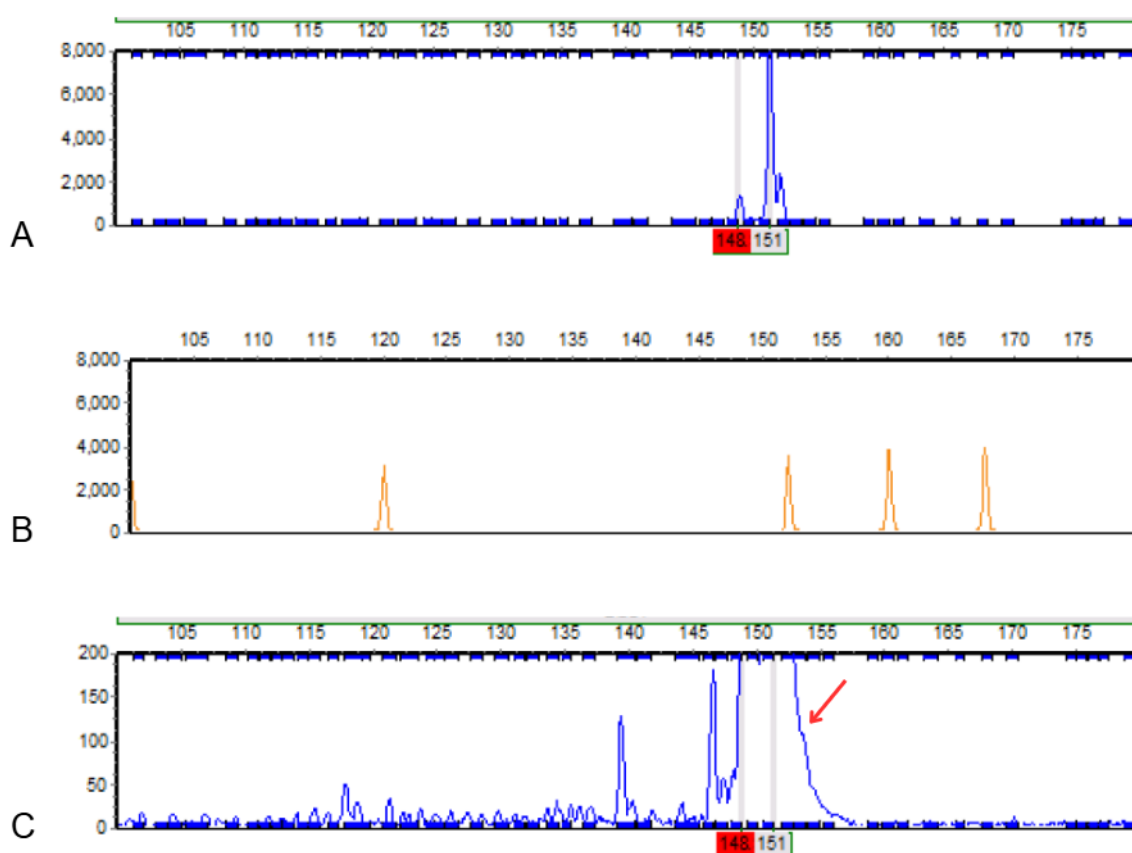


Figura 3. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A. Detecção das expansões de repetição CAG no controle 2, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 148 pb e 151 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizado como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle 2, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 153 pb.

Incluiu-se também um controle positivo previamente caracterizado como portador de uma expansão intermediária em *ATXN2*, descrito em Cozendey (2015) e validado pelo LNCM em análises anteriores, que apresentava 36 repetições ao ser avaliado via PBMC. Na presente análise de fragmentos (Figura 4), esse controle apresentou 25 repetições.

FIGURA 4 – Eletroferograma do Controle Positivo (ELA1 - ALS3/12) obtido por análise de fragmentos

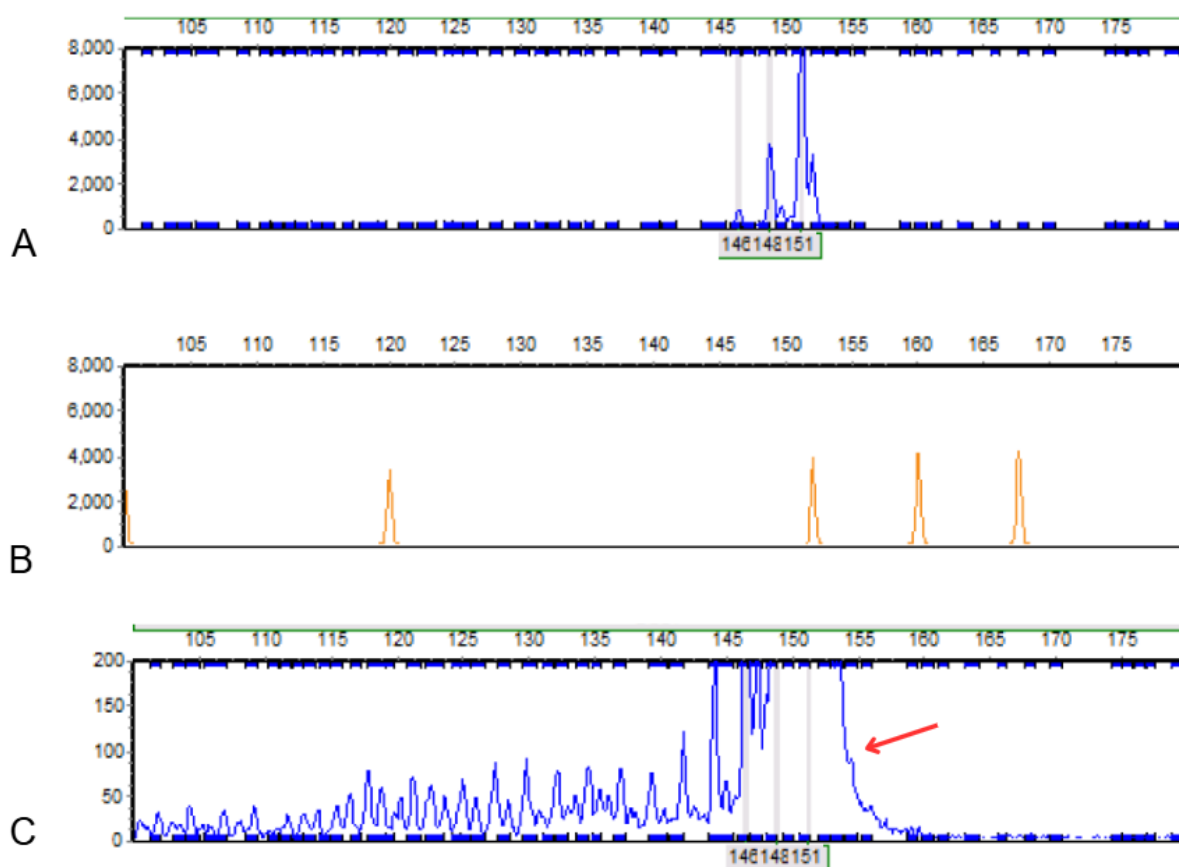


Figura 4. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo ELA (ELA1 - ALS3/12), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 148 pb e 151 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 154 pb.

Além dos controles, foram analisadas oito amostras de pacientes do Rio de Janeiro diagnosticados com ELA. Entre elas, verificou-se que a maior parte apresentou alelos dentro da faixa normal de repetições (Figuras 5, 6 e 7; Figuras Suplementares 1–4).

FIGURA 5 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA12 - ALS105/16) obtido por análise de fragmentos

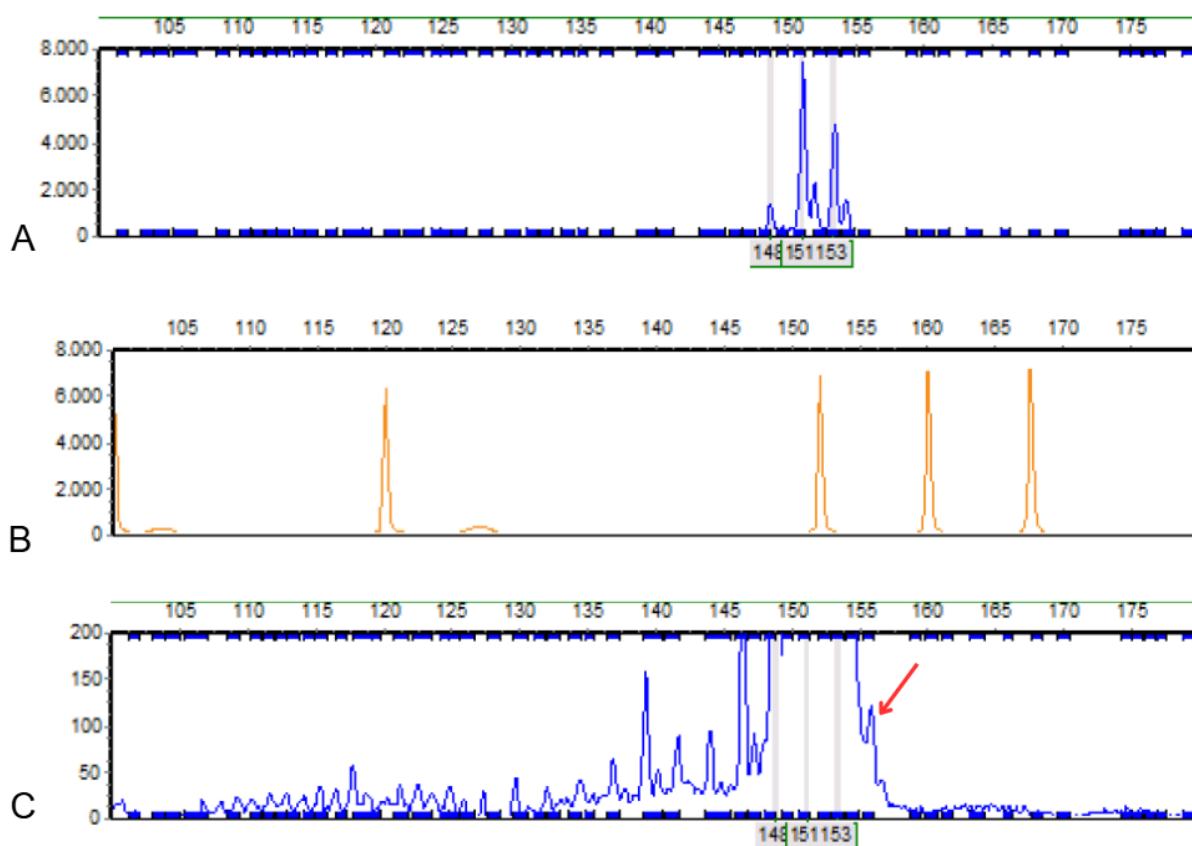


Figura 5. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A. Detecção das expansões de repetição CAG em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA12 - ALS105/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 148 pb e 151 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 156 pb.

FIGURA 6 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA40 - ALS130/16) obtido por análise de fragmentos

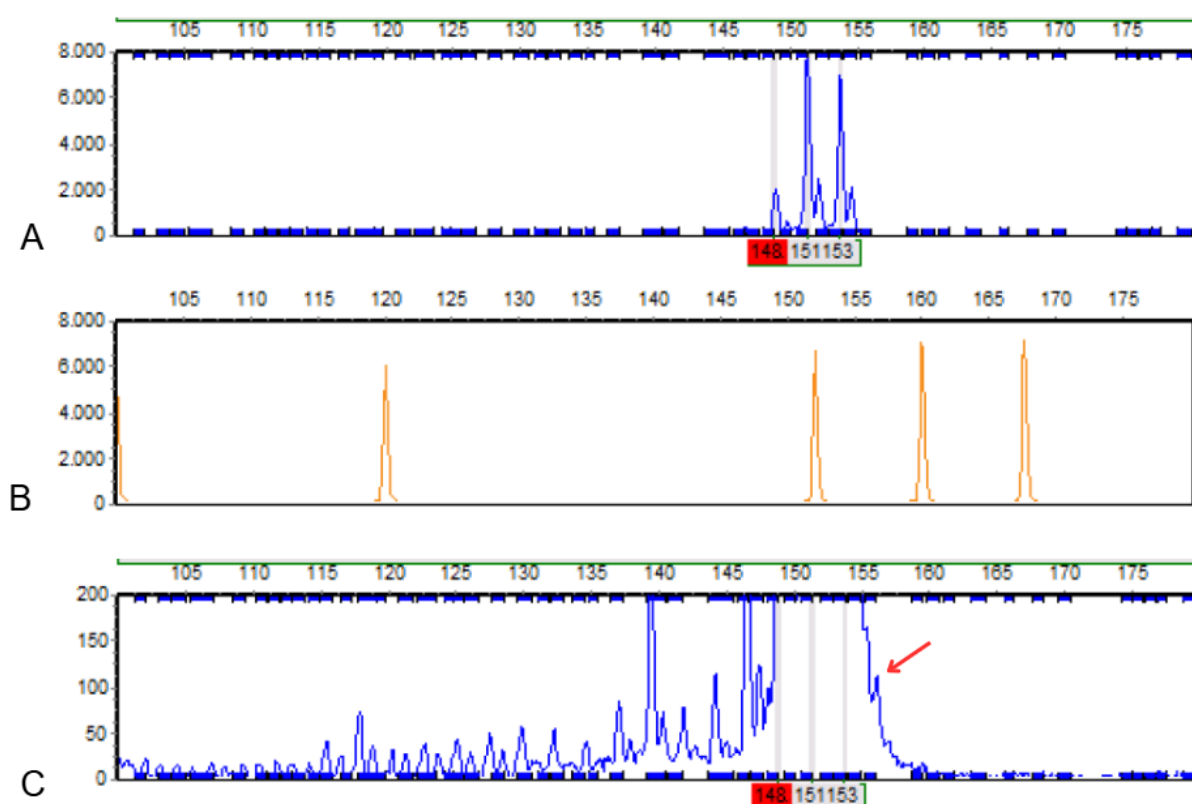


Figura 6. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A. Detecção das expansões de repetição CAG em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA40 - ALS130/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 151 pb e 153 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 156 pb.

FIGURA 7 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA41 - ALS135/16) obtido por análise de fragmentos

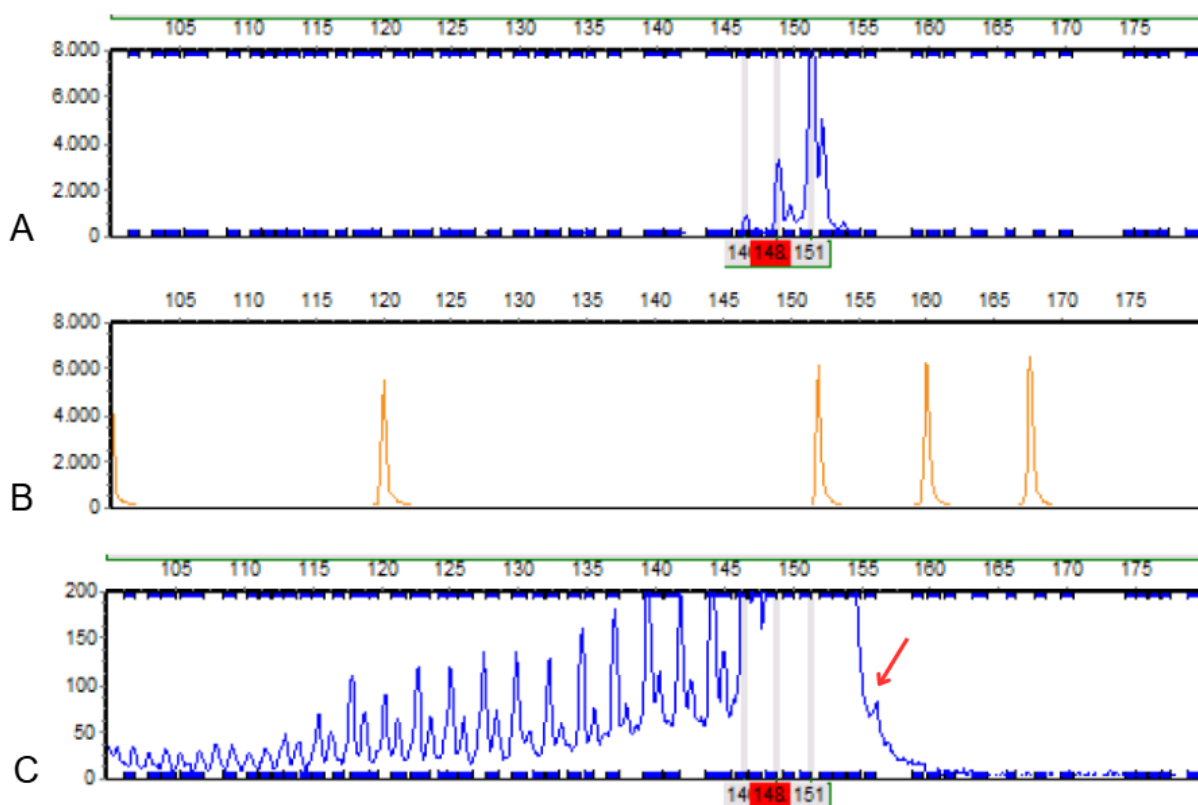


Figura 7. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A. Detecção das expansões de repetição CAG em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA41 - ALS135/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 148 pb e 151 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 156 pb.

Apenas uma amostra exibiu um alelo com aproximadamente 30 repetições (Figura 8), compatível com a categoria de expansão intermediária descrita na literatura.

FIGURA 8 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA18 - ALS111/16) obtido por análise de fragmentos

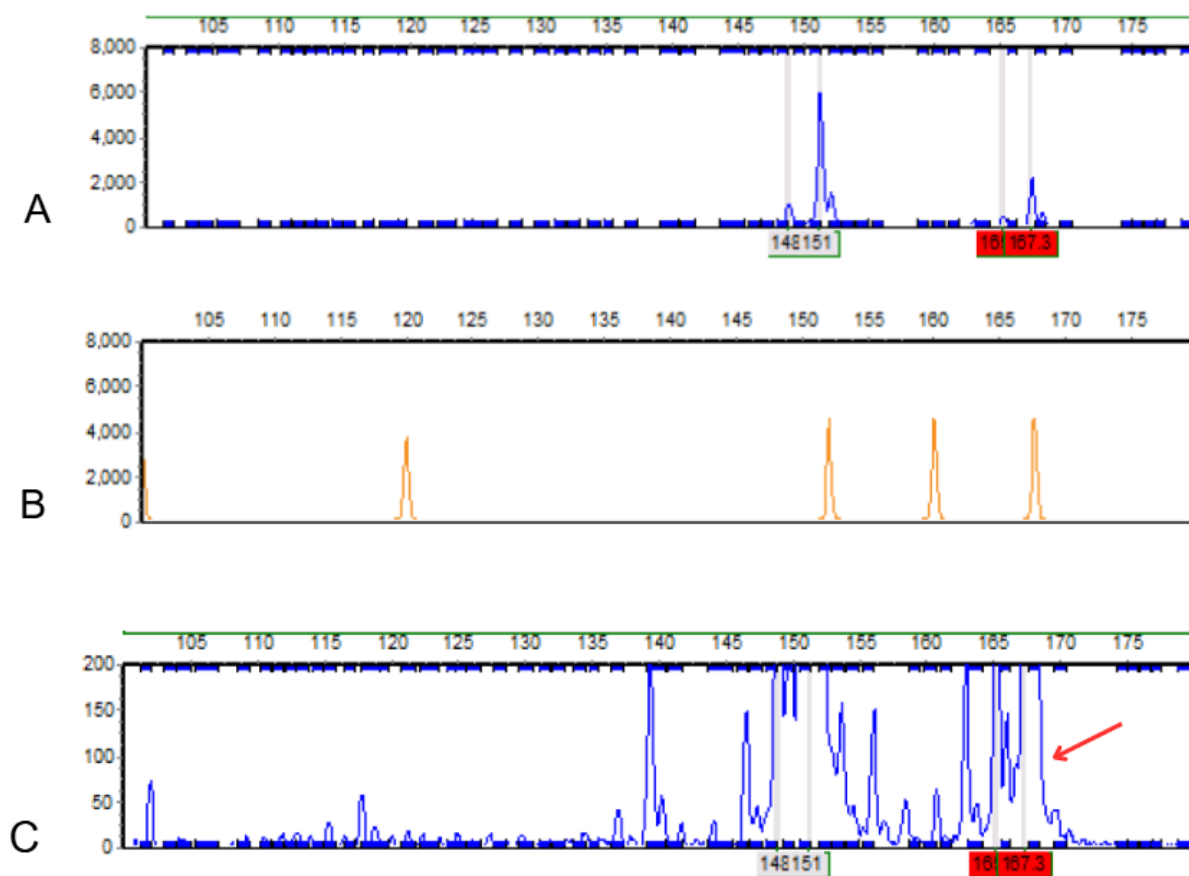


Figura 8. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A. Detecção das expansões de repetição CAG em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA18 - ALS111/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 151 pb e 167 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 168 pb.

Essa organização permitiu uma comparação direta entre os eletroferogramas dos diferentes grupos, evidenciando a distribuição do número de repetições CAG no gene *ATXN2* entre controles e pacientes analisados.

4. DISCUSSÃO

A padronização da análise de fragmentos para detecção de expansões CAG no gene *ATXN2* permitiu estabelecer um método preciso e reprodutível, capaz de diferenciar alelos normais e intermediários em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) atendidos no estado do Rio de Janeiro. Os controles negativos, derivados de iPSCs oriundas de doadores saudáveis, apresentaram 25 repetições, valor compatível com indivíduos sem risco genético associado ao gene *ATXN2*, confirmando a especificidade do ensaio.

Um aspecto relevante para as futuras análises de PolyQ em *ATXN2* é a diferença observada entre o número de repetições CAG detectado no controle positivo obtido neste estudo (26 repetições) vindo de DNA genômico de iPSCs e o valor previamente descrito por Cozendey (2015) para a mesma amostra, vindo diretamente de DNA genômico de PBMC. No presente trabalho, o controle positivo foi derivado de iPSCs, e há evidências de que o processo de reprogramação celular promove uma relevante reconfiguração epigenética, incluindo a normalização de vias de reparo de DNA envolvidas na estabilidade de repetições trinucleotídicas (do inglês, *TNRs*). Como demonstrado por Mollica et al. (2018), a reprogramação para iPSCs em modelos de Doença de Huntington, por exemplo, foi demonstrado que essas células exibem aumento da expressão de genes de reparo e redução da instabilidade de CAG, levando à um reparo parcial de expansões presentes nas células somáticas originais. De forma complementar, Vieira de Sá et al. (2024) destacam a complexidade do uso de iPSCs na investigação de doenças associadas a repetições, relatando que não foi possível gerar linhas isogênicas corrigidas para *ATXN2* e que diferentes mutações de ELA resultam em fenótipos distintos nos moto-neurônios derivados de iPSCs. Esses achados reforçam que a dinâmica de repetição CAG pode ser afetada pelo estado pluripotente e pelo contexto celular, o que torna plausível que a reprogramação tenha desestabilizado ou reduzido discretamente o número de repetições em *ATXN2* no controle positivo analisado neste estudo, justificando o valor inferior observado em relação ao relatado originalmente em PBMCs. Este achado é relevante para futuras triagens genéticas tanto em *ATXN2* como em outros genes, sugerindo que a forma mais segura é conduzir análises diretamente no DNA genômico extraído de PBMC ou vindo da saliva, por não ainda possuir os desafios genômicos/epigenômicos que as células enfrentam durante a reprogramação celular.

A análise das oito amostras de DNA genômico de PBMCs de pacientes com ELA revelou um perfil predominantemente composto por alelos dentro da faixa normal (25 a 26 repetições), com apenas uma amostra, ELA18 (ALS111/16), apresentando cerca de 30 repetições. Este alelo intermediário situa-se dentro do intervalo de risco (≥ 30 CAG), já associado ao aumento de suscetibilidade à ELA e à modulação da toxicidade mediada por TDP-43, conforme relatado em estudos recentes (SABETTA et al., 2025). A relevância desse achado é ampliada pelo fato de que ELA18, segundo registros do painel genético conduzido pelo nosso grupo (não publicado) não apresenta variantes patogênicas conhecidas em genes majoritariamente associados à ELA, como *TARDBP*, *FUS*, *SOD1*, *VAPB*, *SMN1* ou *SMN2*. Assim, a expansão intermediária detectada em *ATXN2* pode representar um relevante fator genético que contribuiu para o desfecho clínico desse paciente (ELDEN et al., 2010; NIJS & VAN DAMME, 2024).

No contexto metodológico, o protocolo padronizado demonstrou alta reprodutibilidade tanto nos controles quanto nas amostras clínicas, com boa definição dos picos principais mesmo na presença de produtos stutter, o que confirma a precisão da estratégia analítica baseada na seleção do pico de maior intensidade como representativo do alelo verdadeiro. A utilização combinada de RP-PCR e eletroforese capilar mostrou-se adequada para diferenciar perfis compatíveis com alelos intermediários, corroborando estudos que estabelecem esse método como uma ferramenta confiável de triagem para expansões de poliglutamina (RENTON et al., 2011). Em adição, o número de repetições reportada nesta triagem está de acordo com a triagem de *ATXN2* conduzida por Tavares de Andrade et al., 2018 em pacientes com ELA de diferentes regiões do Brasil, mas que não inclui Rio de Janeiro. Sendo observada na coorte controle homozigotos com 22 ou 23 PolyQ ou heterozigotos com 23/23.

Em conjunto, os achados deste estudo demonstram que o protocolo padronizado é eficiente para detectar expansões típicas e intermediárias em *ATXN2* e pode ser aplicado ao rastreamento genético de pacientes com ELA no Rio de Janeiro. A identificação de uma expansão em heterozigose em ELA18, correlacionada à ausência de outras variantes genéticas patogênicas conhecidas, reafirma a importância clínica de *ATXN2* como fator de risco na coorte analisada, como já sugerido por Tavares de Andrade et al., 2018 onde foi detectado um odds-ratio = 2,56

para aumento de risco de ELA com PolyQ em ATXN2 acima de 26 repetições. Esses resultados, embora obtidos em escala reduzida, evidenciam o potencial de ampliação para estudos populacionais mais abrangentes, contribuindo para o refinamento das estratégias diagnósticas e para o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na ELA no Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALENDRA, R.; ISAACS, A. M. **C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease**. Nature reviews. Neurology, v. 14, n. 9, p. 544–558, 2018.
- BECKERS, J.; VAN DAMME, P. **Toxic gain-of-function mechanisms in C9orf72 ALS-FTD neurons drive autophagy and lysosome dysfunction**. Autophagy, v. 20, n. 9, p. 2102–2104, 2024.
- BORGHETTI, Vinicius Stefani et al. **Misdiagnoses in a Brazilian population with amyotrophic lateral sclerosis**. Arquivos de neuro-psiquiatria, v. 80, n. 7, p. 676–680, 2022.
- BRADLEY, W. G. et al. **Studies of environmental risk factors in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and a phase I clinical trial of L-Serine**. Neurotoxicity research, v. 33, n. 1, p. 192–198, 2018.
- BROWN, R. H.; AL-CHALABI, A. **Amyotrophic lateral sclerosis**. The New England journal of medicine, v. 377, n. 2, p. 162–172, 2017.
- CERNECKIS, J.; CAI, H.; SHI, Y. **Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications**. Signal transduction and targeted therapy, v. 9, n. 1, p. 112, 2024.
- CHUGH, Chandril. **Acute ischemic stroke: Management approach**. Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine, v. 23, n. Suppl 2, p. S140–S146, 2019.
- CIURA, S. et al. **The most prevalent genetic cause of ALS-FTD, C9orf72 synergizes the toxicity of ATXN2 intermediate polyglutamine repeats through the autophagy pathway**. Autophagy, v. 12, n. 8, p. 1406–1408, 2016.
- COSTA, R. G. et al. **The polyglutamine protein ATXN2: from its molecular functions to its involvement in disease**. Cell death & disease, v. 15, n. 6, p. 415, 2024.
- COZENDEY, Tatiane Duarte. **Análise de genes envolvidos na esclerose lateral amiotrófica para diagnóstico diferencial**. 2015. 183 f. Tese (Doutorado em Biologia

Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

DA COSTA, Lariza Maria et al. **Analysis of survival time and functional progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A longitudinal study.** Brazilian journal of physical therapy, v. 28, n. 100836, p. 100836, 2024.

DEJESUS-HERNANDEZ, M. et al. **Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS.** Neuron, v. 72, n. 2, p. 245–256, 2011.

DIMOS, J. T. et al. **Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons.** Science (New York, N.Y.), v. 321, n. 5893, p. 1218–1221, 2008.

ELDEN, A. C. et al. **Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS.** Nature, v. 466, n. 7310, p. 1069–1075, 2010.

GREENBERG, D. A.; AMINOFF, M. J.; SIMON, R. P. **Neurologia clínica** - 8.ed. [s.l.] AMGH Editora, 2014.

GUBERT, F. et al. **Generation of patient-specific pluripotent induced stem cell line UFRJi007-A from a Brazilian familial amyotrophic lateral sclerosis patient.** Stem cell research, v. 39, n. 101490, p. 101490, 2019.

HANDESAKER, R. E. et al. **Long somatic DNA-repeat expansion drives neurodegeneration in Huntington's disease.** Cell, v. 188, n. 3, p. 623- 639.e19, 2025.

IBGE. **Censo 2022: número de pessoas com 65 anos ou mais de idade cresceu 57,4% em 12 anos.** Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/38186-censo-2022-numero-de-pessoas-com-65-anos-ou-mais-de-idade-cresceu-57-4-em-12-anos>>. Acesso em: 4 dez. 2025.

JO, M. et al. **The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: integrating insights from clinical and experimental studies.** Experimental & molecular medicine, v. 52, n. 10, p. 1652–1662, 2020.

KJÆLDGAARD, Anne-Lene et al. **Prediction of survival in amyotrophic lateral sclerosis: a nationwide, Danish cohort study.** BMC neurology, v. 21, n. 1, p. 164, 2021.

LATTANTE, S. et al. **Contribution of ATXN2 intermediary polyQ expansions in a spectrum of neurodegenerative disorders.** *Neurology*, v. 83, n. 11, p. 990–995, 2014.

LINDEN-JUNIOR, E. et al. **Prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in the city of Porto Alegre, in Southern Brazil.** *Arquivos de neuro-psiquiatria*, v. 71, n. 12, p. 959–962, 2013.

MA, X. R. et al. **TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD-ALS gene UNC13A.** *Nature*, v. 603, n. 7899, p. 124–130, 2022.

MARZO, R. R. et al. **Determinants of active aging and quality of life among older adults: systematic review.** *Frontiers in public health*, v. 11, p. 1193789, 2023.

MEHTA, Paul et al. **Prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in the United States using established and novel methodologies,** 2017. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, v. 24, n. 1–2, p. 108–116, 2023.

MOLLICA, Peter A. et al. **Epigenetic alterations mediate iPSC-induced normalization of DNA repair gene expression and TNR stability in Huntington's disease cells.** *Journal of cell science*, v. 131, n. 13, 2018.

MOTATAIANU, Anca et al. **Clinical and paraclinical predictors of survival in amyotrophic Lateral Sclerosis: Results from a three-year longitudinal cohort study.** *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, v. 13, n. 3, p. 170, 2025.

MOURA, M. C.; CASULARI, L. A.; CARVALHO GARBI NOVAES, M. R. **Ethnic and demographic incidence of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Brazil: A population based study.** *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, v. 17, n. 3–4, p. 275–281, 2016.

NIJS, M.; VAN DAMME, P. **The genetics of amyotrophic lateral sclerosis.** *Current opinion in neurology*, v. 37, n. 5, p. 560–569, 2024.

NUNES, K. et al. **Admixture's impact on Brazilian population evolution and health.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 388, n. 6748, p. eadl3564, 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Rare diseases: a global health priority for equity and inclusion.** Geneva: WHO, 2025. Documento EB156/CONF./2. Disponível em: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB156/B156_CONF2-en.pdf Acesso em: 01 junho 2025.

Publication Number 4474504 Revision B For Research Use Only. Not intended for use in diagnostic procedures. Disponível em:

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/fragment-analysis-chemistry-guide.pdf> . Acesso em: 16 nov. 2025.

PULST, S. M. **Spinocerebellar ataxia type 2: A review and personal perspective.** Neurology. Genetics, v. 11, n. 1, p. e200225, 2025.

RENTON, A. E. et al. **A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD.** Neuron, v. 72, n. 2, p. 257–268, 2011.

RIZEA, R. E. et al. **Understanding amyotrophic lateral sclerosis: Pathophysiology, diagnosis, and therapeutic advances.** International journal of molecular sciences, v. 25, n. 18, 2024.

ROWLAND, L. P.; SHNEIDER, N. A. **Amyotrophic lateral sclerosis.** The New England journal of medicine, v. 344, n. 22, p. 1688–1700, 2001.

SABETTA, Eleonora et al. **Tandem repeat expansions and copy number variations as risk factors and diagnostic tools for amyotrophic lateral sclerosis.** Frontiers in neurology, v. 16, p. 1522445, 2025.

SCAHILL, R. I. et al. **Somatic CAG repeat expansion in blood associates with biomarkers of neurodegeneration in Huntington's disease decades before clinical motor diagnosis.** Nature medicine, v. 31, n. 3, p. 807–818, 2025.

SCOLES, D. R. et al. **Repeat associated non-AUG translation (RAN translation) dependent on sequence downstream of the ATXN2 CAG repeat.** PloS one, v. 10, n. 6, p. e0128769, 2015.

SELLIER, C. et al. **Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death.** The EMBO journal, v. 35, n. 12, p. 1276–1297, 2016.

SUK, T. R.; ROUSSEAUX, M. W. C. **The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis.** Molecular neurodegeneration, v. 15, n. 1, p. 45, 2020.

TAVARES DE ANDRADE, H. M. et al. **Intermediate-length CAG repeat in ATXN2 is associated with increased risk for amyotrophic lateral sclerosis in Brazilian patients.** Neurobiology of aging, v. 69, p. 292.e15-292.e18, 2018.

VAN DER ENDE, E. L. et al. **Unravelling the clinical spectrum and the role of repeat length in C9ORF72 repeat expansions.** Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, v. 92, n. 5, p. 502–509, 2021.

VASQUES, J. F.; MENDEZ-OTERO, R.; GUBERT, F. **Modeling ALS using iPSCs: is it possible to reproduce the phenotypic variations observed in patients in vitro?** Regenerative medicine, v. 15, n. 7, p. 1919–1933, 2020.

VIEIRA DE SÁ, R. et al. **ATAXIN-2 intermediate-length polyglutamine expansions elicit ALS-associated metabolic and immune phenotypes.** Nature communications, v. 15, n. 1, p. 7484, 2024.

WANG, H.-Y. et al. **Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family.** Genomics, v. 83, n. 1, p. 130–139, 2004.

WANG, M.-D. et al. **Intermediate CAG repeat expansion in the ATXN2 gene is a unique genetic risk factor for ALS--a systematic review and meta-analysis of observational studies.** PloS one, v. 9, n. 8, p. e105534, 2014.

WOLFSON, C. et al. **Global prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review.** Neurology, v. 101, n. 6, p. e613–e623, 2023.

6. MATERIAL SUPPLEMENTAR

FIGURA SUPLEMENTAR 1 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA32 - *ALS124/16*) obtido por análise de fragmentos

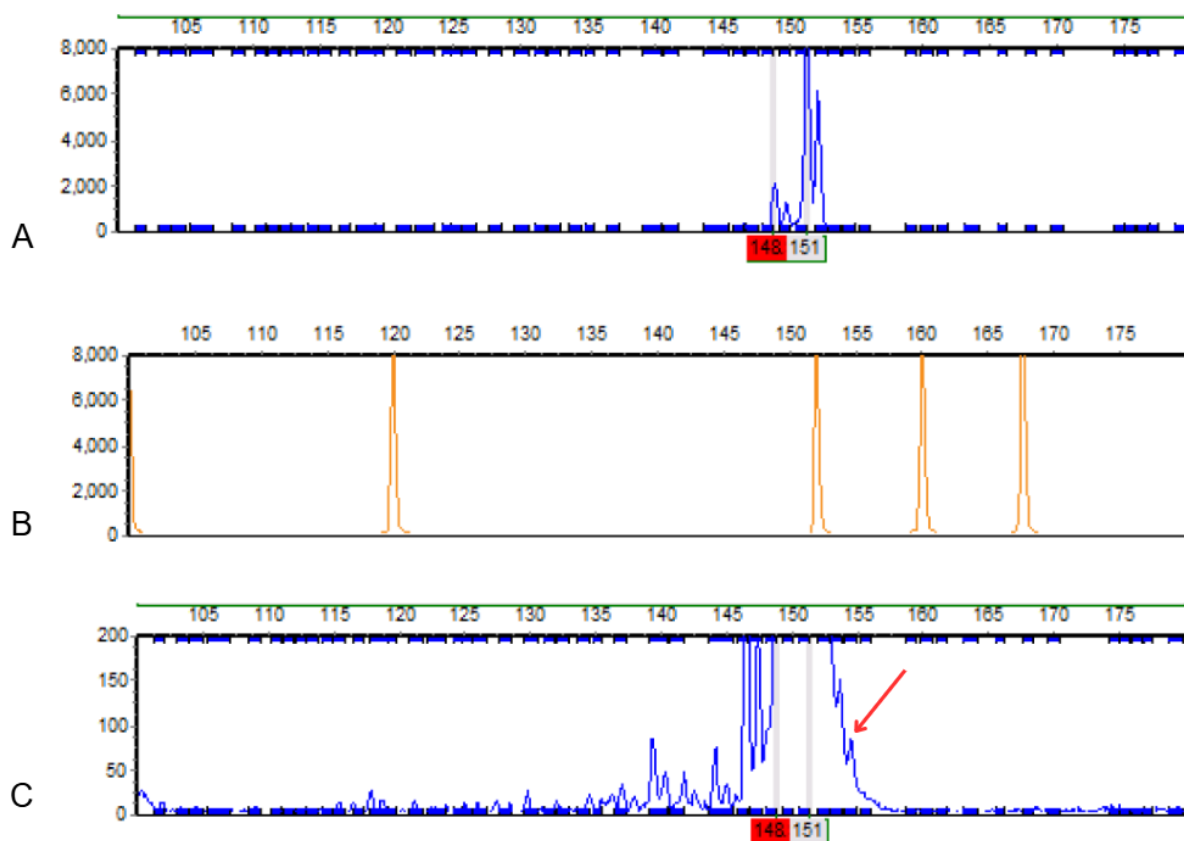


Figura Suplementar 1. Eletroferogramas representando os picos amplificados de ATXN2. A.

Detecção das expansões de repetição CAG em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA32 - ALS124/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos. No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 148 pb e 151 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno**, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos. No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo**, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude. A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 155 pb.

FIGURA SUPLEMENTAR 2 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA34 – ALS126/16) obtido por análise de fragmentos

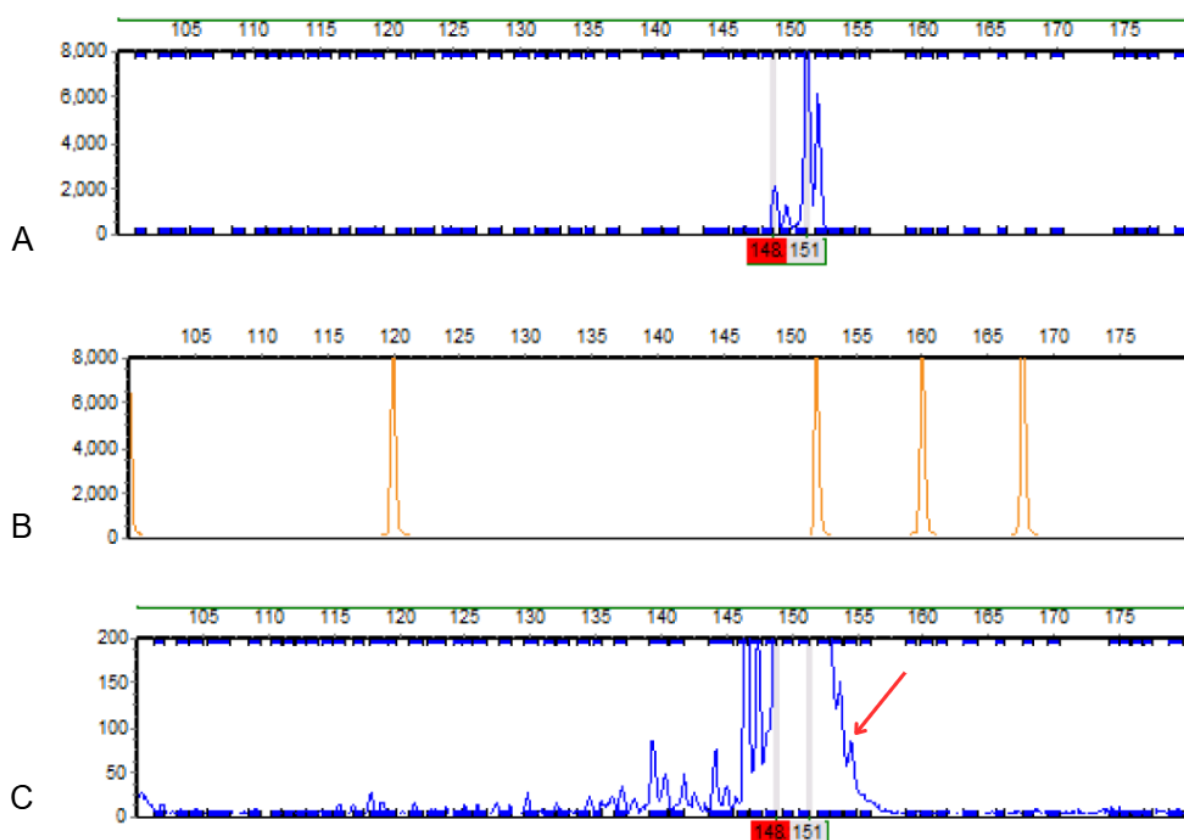


Figura Suplementar 2. Eletroferogramas representando os picos amplificados de ATXN2. **A. Detecção das expansões de repetição CAG** em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA34 - ALS126/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos. No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 148 pb e 151 pb. **B. Detecção dos picos de**

controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos. No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.** A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 155 pb.

FIGURA SUPLEMENTAR 3 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA37 - ALS129/16) obtido por análise de fragmentos

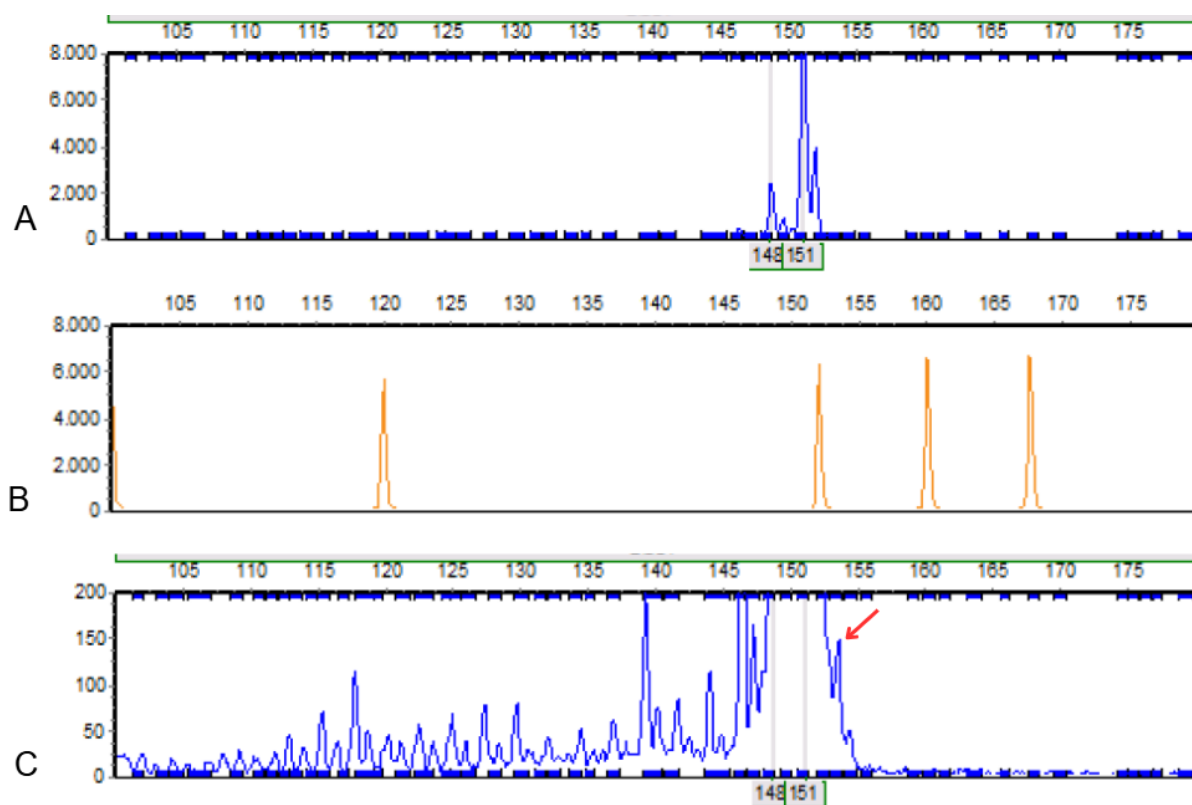


Figura Suplementar 3. Eletroferogramas representando os picos amplificados de ATXN2. **A. Detecção das expansões de repetição CAG em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA37 - ALS129/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 148 pb e 151 pb. **B. Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos.** No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C. Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude.**

dos picos de menor amplitude. A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 154 pb.

FIGURA SUPLEMENTAR 4 – Eletroferograma de amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA44 - ALS143/16) obtido por análise de fragmentos

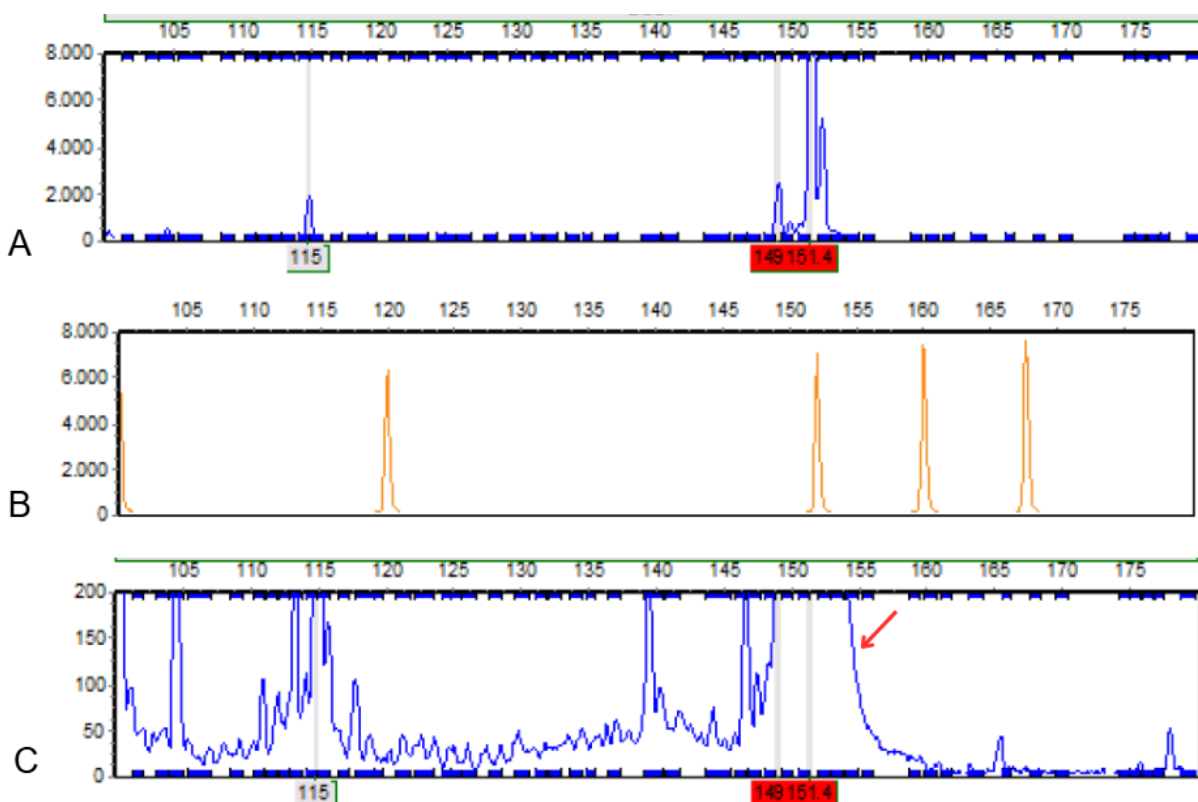


Figura Suplementar 4. Eletroferogramas representando os picos amplificados de *ATXN2*. **A.** Detecção das expansões de repetição CAG em amostra de paciente diagnosticado com ELA (ELA44 - ALS143/16), com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos. No canal *Blue* (FAM), destacam-se dois picos que correspondem aos alelos de tamanhos aproximados de 149 pb e 151 pb. **B.** Detecção dos picos de controle interno, com o eixo Y ajustado para o limite de 8.000 unidades para uma visualização ampla do perfil de picos. No canal *Orange*, visualizam-se múltiplos picos de controle interno (LIZ 500), utilizados como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos. **C.** Detecção das expansões de repetição CAG no controle positivo, com o eixo Y reduzido a 200 unidades para detalhamento dos picos de menor amplitude. A seta indica o último pico detectado pelo software GeneMarker, aferindo um tamanho de aproximadamente 154 pb.