

# Análisis molecular de los repetidos CAG en pacientes mexicanos con ataxia espinocerebelosa tipo 2

Jonathan J. Magaña,<sup>a,b\*</sup> María Dolores Vergara,<sup>a,c</sup> Mónica Sierra-Martínez,<sup>d</sup>  
Elvia García-Jiménez,<sup>d</sup> Facundo Rodríguez-Antonio,<sup>a</sup> María del Rocío Gómez,<sup>b</sup>  
Margarita Valdés-Flores<sup>b</sup> y Bulmaro Cisneros<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN, México D.F., México

<sup>b</sup>Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, México D.F., México

<sup>c</sup>División de Investigación, Hospital de La Mujer, Secretaría de Salud, México, D. F., México

<sup>d</sup>Genética, Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud, México D.F., México

Recibido en versión modificada: 19 de mayo de 2008

Aceptado: 27 de mayo de 2008

## RESUMEN

**Antecedentes:** La ataxia espinocerebelosa tipo 2 es causada por la expansión del repetido CAG presente en el exón 1 del gen de la ataxina-2, lo cual origina la incorporación de un segmento de poliglutaminas en la proteína mutante.

**Métodos:** Mediante reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis capilar se determinó el número de repetidos CAG del gen de la ataxina-2 en 66 individuos pertenecientes a tres familias mexicanas diagnosticadas clínicamente con ataxia espinocerebelosa tipo 2, y en 400 individuos de una muestra de población mestiza mexicana.

**Resultados:** Se identificó la expansión del repetido CAG en 11 sujetos con sintomatología de ataxia espinocerebelosa tipo 2 y en cuatro individuos asintomáticos, lo que confirmó el diagnóstico en dos de las tres familias analizadas. Se determinó que los pacientes con mayor número de repetidos desarrollaron la sintomatología de la enfermedad a una edad más temprana, fenómeno conocido como "anticipación". Los alelos silvestres presentaron un rango entre 13 y 30 repetidos CAG, siendo el alelo de 22 repetidos el más frecuente, mientras que los alelos mutados mostraron un rango de 36 a 54 repetidos.

**Conclusiones:** La identificación de la expansión del repetido CAG del gen de la ataxina-2 confirmó el diagnóstico clínico de ataxia espinocerebelosa tipo 2.

### Palabras clave:

Ataxia espinocerebelosa 2, repetidos trinucleótidos, electroforesis capilar

## SUMMARY

**Background:** Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) results from the expansion of a CAG triplet located within the coding sequence of the ataxin-2 gene, which ultimately provokes the incorporation of a stretch of polyglutamines in the mutant protein.

**Methods:** We determined by PCR and capillary electrophoresis the number of ataxin2 gene CAG repeats in 66 individuals belonging to 3 families, clinically diagnosed with SCA2, and 400 subjects from a sample of the mestizo Mexican population.

**Results:** The CAG repeat expansion was found in 11 symptomatic subjects and four asymptomatic individuals, confirming the SCA2 clinical diagnosis in two out of the three families studied. We noted that patients with longer CAG repeat numbers have an early disease onset, a phenomenon known as anticipation. Wild-type alleles showed a CAG repeat range between 13 and 30, and the allele carrying 22 CAG repeats was the most common among our sample. Mutant alleles also displayed a range between 36 and 54 CAG repeats.

**Conclusions:** The identification of the CAG repeat expansion facilitates an accurate SCA2 diagnosis.

### Key words:

Spinocerebellar ataxia 2, trinucleotide repeats, diagnostic, genetics, capillary electrophoresis

## Introducción

Las ataxias cerebelosas (SCA, *spinocerebellar ataxias*) conforman un grupo de trastornos neurodegenerativos clínica y genéticamente heterogéneos con un patrón de herencia autosómica dominante. Las SCA presentan rasgos clínicos bien definidos compartidos por la mayoría de ellas:

ataxia cerebelosa progresiva, hallazgos neurológicos extracerebelosos que incluyen oftalmoplejía, atrofia óptica, neuropatía periférica y signos piramidales y extrapiramidales.<sup>1</sup> Con base en sus características clínicas fueron clasificadas inicialmente en tres tipos,<sup>2</sup> sin embargo, la identificación de diferentes genes relacionados con este grupo de enferme-

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Bulmaro Cisneros. Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 México D.F., México. Tel.: (55) 5061 3339. Fax: (55) 5061 3931. Correo electrónico: bcisnero@cinvestav.mx

dades ha permitido que se conozcan actualmente hasta 28 variedades.<sup>3,4</sup> Con la caracterización molecular de estos genes se ha establecido que la expansión de repetidos de tres o cuatro nucleótidos (trinucleótidos o tetranucleótidos), presentes tanto en regiones génicas codificantes como no codificantes, es el tipo de mutación que origina la mayoría de las SCA.<sup>5,6</sup> El repetido más común asociado es el trinucleótido CAG, el cual causa, entre otras, las ataxias SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y SCA17.<sup>7</sup>

Los repetidos CAG asociados a las SCA son altamente polimórficos; sin embargo, existe un número de repeticiones que representa el umbral entre el estado normal y patológico de los diferentes tipos de SCA. De manera general, los individuos normales tienen alelos con un número de repetidos menor de 40, mientras que los pacientes con SCA tienen alelos mutantes con repeticiones por arriba de este número.<sup>1</sup> Debido a que la mayoría de los síntomas comienzan en la edad adulta y que no existe cura para estas patologías, el diagnóstico molecular ha sido esencial para identificar tempranamente el tipo de ataxia en cada familia afectada y ofrecer consejo genético y ayuda psicológica.<sup>8</sup>

La SCA2 es una de las ataxias más comunes en el mundo;<sup>9,10</sup> en este caso, los tripletes CAG se ubican en el primer exón del gen denominado ataxina-2, en la región cromosómica 12q23-24. Este gen está constituido por 25 exones (4500pb) y su producto, la ataxina-2, es una proteína de 140 kDa (1312 aminoácidos) que contiene en su dominio amino-terminal una región variable de poliglutaminas codificada por los tripletes CAG.<sup>11</sup> Aunque no se conoce la función de la ataxina-2, se ha relacionado con la organización del citoesqueleto de las neuronas y el metabolismo de ARN.<sup>12</sup> Se ha demostrado que los individuos normales tienen de 14 a 31 repetidos CAG en el gen de la ataxina-2, con una o dos interrupciones de tipo CAA entre las unidades de repetidos, mientras que los pacientes presentan de 32 a 200 repeticiones de este triplete sin interrupciones.<sup>13</sup> Es importante mencionar que no existe traslapamiento entre los alelos silvestres y mutantes del gen de la ataxina-2, por lo que la identificación de la mutación ha servido como base para el diagnóstico certero de la enfermedad en todas las poblaciones analizadas a la fecha.<sup>1,13-18</sup> Así mismo, el diagnóstico molecular de la SCA2 posibilita que se pueda pronosticar la gravedad de la enfermedad, ya que esta patología presenta el fenómeno de "anticipación", el cual consiste en un aumento en el número de repetidos CAG en generaciones sucesivas de familias afectadas, lo que ocasiona un inicio más temprano de la enfermedad y una mayor severidad en la sintomatología.<sup>1,4</sup>

Recientemente se determinó que la SCA2 es la ataxia más común en la población mexicana (45.4%) seguida por la SCA10 (13.9%), por lo que se sugiere que las pruebas genéticas en familias mexicanas deben iniciarse con el diagnóstico de SCA2.<sup>19</sup> En el presente trabajo se estudiaron tres familias mexicanas con datos clínicos y de imagenología compatibles con SCA. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis capilar se determinó el número de repetidos CAG del gen de la ataxina-2 en los individuos de las familias afectadas, y se identificó la presencia de SCA2 en dos de éstas. Simultáneamente, con el fin de

conocer la distribución de este polimorfismo en la población mexicana, se analizaron 400 individuos sanos no relacionados entre sí de una muestra de población mestiza mexicana.

## Material y métodos

### Muestra del estudio

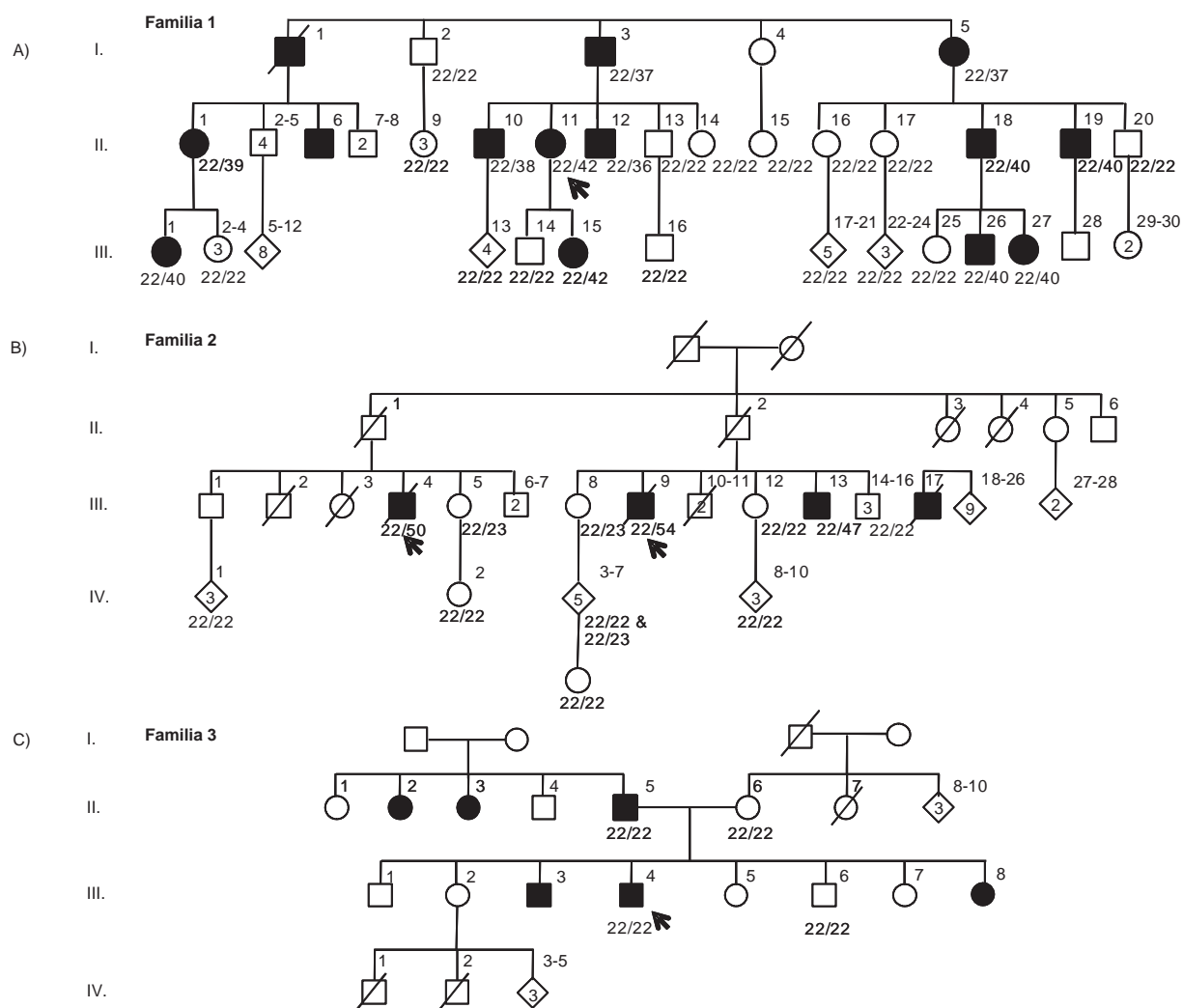
Se analizaron 66 individuos pertenecientes a tres familias con diagnóstico clínico de SCA2 y 400 individuos sanos no relacionados biológicamente entre sí. Los sujetos de estudio son originarios de la zona central del país con al menos tres generaciones nacidas en la República Mexicana, y se integraron de manera voluntaria al presente estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Diagnóstico clínico de SCA2, el cual se llevó a cabo en el Hospital Juárez de México conforme los criterios estándar informados;<sup>2</sup> se identificaron signos y síntomas como marcha atáxica, debilidad muscular, signos piramidales y extrapiramidales. Se realizó exploración neurológica obteniendo datos como oftalmoplejía supranuclear, fasciculaciones faciales, movimientos oculares lentos, nistagmo, problemas de lenguaje, hiporreflexia, entre otros. Además, se realizó electromiografía y tomografía axial computarizada. En dos casos se llevó a cabo una biopsia de nervio sural.
- Familiares de primer y segundo grado de los casos índice.

Se excluyeron del estudio individuos con ataxia adquirida debido a problemas de alcoholismo o de otra etiología. Los individuos analizados pertenecientes a cada familia se muestran en la figura 1.

### Análisis molecular de los repetidos CAG del gen de la ataxina-2

El ADN genómico se extrajo a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando el método de fenol-cloroformo.<sup>20</sup> El análisis del gen de la ataxina-2 se realizó mediante PCR empleando un par de oligonucleótidos que flanquean los repetidos CAG.<sup>14</sup> La secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente: Ataxia1 5'-GGGCCCTCACCATGTCG-3'; y Ataxia2 5'-CGGGCTTGCGGACATTGG-3'. El oligonucleótido Ataxia1 se marcó con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM). La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 6 µl que contenía 15 ng de ADN humano, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 200 µM de cada dNTP; 0.6 µl de la solución amortiguadora de reacción 10x (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger), 0.5 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger) y 31% de betaína (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Ger). La reacción de PCR consistió de 28 ciclos, incluyendo un paso de desnaturalización a 96°C por 60 segundos, la hibridización a 59°C por 30 segundos y la polimerización a



**Figura 1.** Análisis del repetido CAG del gen de la ataxina-2 en tres familias mexicanas. Se muestran los alelos identificados en cada uno de los individuos analizados.

72°C por 60 segundos. Posteriormente, una alícuota de la reacción de PCR se mezcló con formamida desionizada y una alícuota del marcador de peso molecular interno (ABI GeneScan-500 TAMRA); enseguida, la mezcla se calentó a 95°C por siete minutos y se transfirió inmediatamente a hielo por cinco minutos. Las muestras se analizaron por medio de electroforesis capilar en el secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando una temperatura constante (60°C), un voltaje de 15 kV y un tiempo de corrida de 24 minutos. Para el análisis de los alelos y la genotipificación se empleó el programa GeneScan.

### Secuenciación de ADN

El número de repetidos presente en cada alelo se determinó mediante secuenciación de ADN, para lo cual se utilizó el reactivo *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y el secuenciador automático ABI PRISM 310.

### Análisis estadístico

Para establecer una relación entre el número de repetidos CAG y la edad de inicio de la SCA 2 se empleó el coeficiente de correlación de Pearson.

## Resultados

### Análisis molecular del repetido CAG en familias mexicanas con SCA2

Los signos y síntomas observados con mayor frecuencia en los pacientes fueron ataxia de la marcha y atrofia cerebelar (73%), oftalmoplejía supranuclear (40%), neuropatía periférica (33%), signos piramidales (33%), fasciculaciones faciales (27%) y nistagmo (20%). Se llevó a cabo el diagnóstico molecular de la SCA2 como se describe en la sección de Material y métodos, y los alelos mutantes fueron secuenciados.

dos para identificar de manera precisa el número de repetidos. Es importante mencionar que no se detectaron interrupciones entre las unidades de repetidos. En la figura 1 se presentan las tres genealogías estudiadas y se indican los alelos identificados en cada uno de los individuos analizados.

En la familia 1 (Figura 1A) se analizaron 40 miembros pertenecientes a tres generaciones diferentes, determinándose la expansión del repetido CAG en 12 individuos. En la primera generación se diagnosticaron dos pacientes (I-3 y I-5): ambos individuos portan un alelo mutante con 37 repetidos CAG y presentaron los primeros síntomas de la enfermedad a una edad similar (40 y 41 años, respectivamente, Cuadro I). Actualmente estos pacientes presentan ataxia de la marcha y atrofia cerebelar, sin embargo, el individuo I-5 muestra mayor gravedad debido probablemente a que su edad avanzada (71 años) ha ocasionado un desarrollo más pronunciado de la enfermedad en comparación con el individuo I-3, que tiene 55 años.

En la segunda generación, los pacientes II-1, II-10, II-11, II-18 y II-19 manifiestan un incremento en el número de repetidos, una edad de inicio de la sintomatología más temprana y un incremento en la gravedad de la enfermedad respecto a los individuos de la primera generación (Cuadro I). Actualmente la edad de estos individuos oscila entre 35 y 45 años y muestran una sintomatología compuesta por cuadros vertiginosos asociados a debilidad muscular progresiva, marcha atáxica, movimientos oculares lentos con abolición de nistagmo, sacadas lentas, problemas de lenguaje, bradipsiquia, temblor en ambas manos y, con excepción de los individuos II-1 y II-10, disimetría y disidiadococinesia. De manera interesante, a pesar de que el paciente II-12 inició con la sintomatología de la enfermedad a una edad más temprana que los de la primera generación, solo manifiesta datos comunes de marcha atáxica y atrofia cerebelar, lo anterior puede ser debido a que no tiene un incremento en el número de repetidos CAG del alelo mutante respecto a la primera generación.

Finalmente se identificaron cuatro pacientes con edades de 11, 12, 13 y 16 años (III-1, III-15, III-26 y III-27) que portan de 40 a 42 repetidos CAG en el alelo mutante pero que no presentaron síntomas de SCA2 al momento del estudio.

Respecto a la familia 2 (Figura 1B) se evaluaron 22 individuos de cuatro generaciones y se determinó mutación en tres pacientes de la tercera generación. Los sujetos III-4 y III-9 fallecieron debido a la gravedad de la enfermedad durante el desarrollo de este estudio. El sujeto III-4, que presentó 50 repetidos CAG, inició con la sintomatología de SCA2 a la edad de 16 años y falleció a los 29 años; el individuo III-9, que presentó 54 repetidos CAG, inició con síntomas de SCA2 a los 13 años y falleció a la edad de 23 años. Finalmente, el individuo III-13, que presentó 47 repetidos CAG empezó con SCA2 a los 14 años y sobrevive a la edad de 41 años.

Por último se analizaron cuatro individuos de la familia 3 (Figura 1C), dos personas sanas (II-6 y III-6) y dos pacientes que iniciaron con síntomas de SCA2 a los 21 (III-4) y 30 años (III-5). De manera interesante no se encontró la expansión del repetido CAG en ningún miembro de esta familia.

En la figura 2 se muestra la distribución de los alelos mutantes identificados en las tres familias analizadas; el rango del número de repetidos CAG fue de 36 a 54. El alelo más frecuente fue de 40 repetidos, seguido por los alelos de 36, 37 y 42 tripletes CAG. En la figura 3 se observa que existe una correlación inversamente proporcional entre el número de repetidos CAG y la edad de inicio de la enfermedad ( $r = -0.897$ ,  $p < 0.05$ ), fenómeno conocido como "anticipación". Es importante mencionar que los pacientes con más de 45 repeticiones desarrollaron la enfermedad antes de los 20 años de edad.

#### Distribución de los repetidos CAG del gen de la ataxina-2 en una muestra de la población mestiza mexicana

Se amplificó el repetido CAG del gen de la ataxina-2 en una muestra de 400 individuos de la población mestiza mexicana. En la figura 4 se presenta la distribución de los alelos CAG; se identificaron 16 alelos diferentes con un rango de 13 a 30 repetidos CAG. El alelo de 22 repetidos predominó con una frecuencia de 90.8%, seguido lejanamente por el alelo de 23 repetidos con una frecuencia de 4.8%. Los 14 alelos restantes suman en conjunto 4.4%.

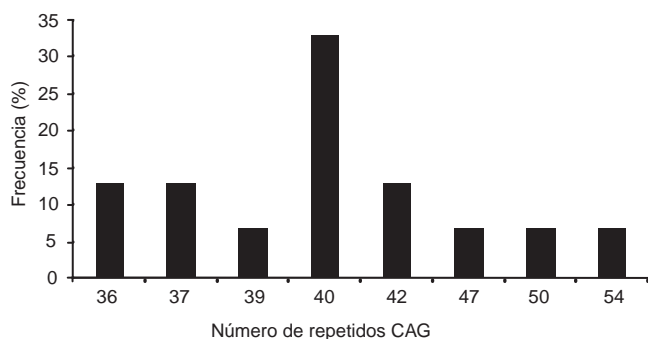
En el cuadro II se observa que la distribución del repetido CAG asociado a la SCA2 no presenta diferencias estadísticamente significativas entre diferentes grupos poblacionales en cuanto al número promedio de repetidos, la varianza y el rango de los repetidos presentes en los alelos de cada población.<sup>21</sup>

**Cuadro I.** Edad de inicio de la sintomatología y número de repetidos en los pacientes con SCA2

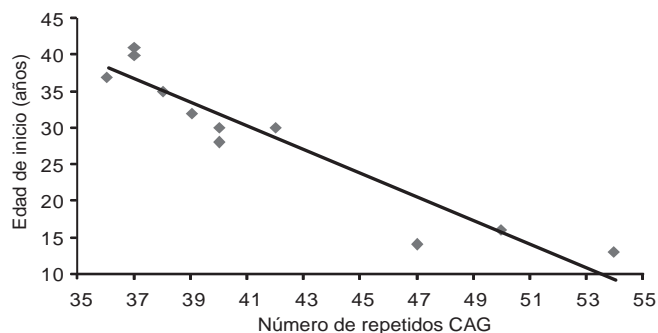
Edad de inicio (años)	Número de repetidos	Genealogía
<b>Familia 1</b>		
As	42	III-15
As	40	III-1
As	40	III-26
As	40	III-27
28	40	II-19
30	40	II-18
30	42	II-11
32	39	II-1
35	38	II-10
37	36	II-12
40	37	I-3
41	37	I-5
<b>Familia 2</b>		
13	54	III-9
14	47	III-13
16	50	III-4
<b>Familia 3</b>		
21	22*	III-4
30	22*	II-5

As=individuos que aún no presentan sintomatología.

\*Número de repetidos normal.



**Figura 2.** Distribución alélica de los repetidos CAG expandidos en individuos afectados con SCA2.



**Figura 3.** Correlación entre el número de repetidos CAG del gen de la ataxina-2 y la edad de inicio de la SCA2.

## Discusión

El número de enfermedades hereditarias causadas por la expansión de trinucleótidos se ha incrementado en los últimos años. Los trinucleótidos repetidos están presentes en condiciones normales en el genoma humano, sin embargo, bajo ciertas circunstancias estos repetidos se pueden incrementar más allá de los límites considerados normales, dando lugar a una mutación que favorece la presencia de cierta enfermedad.<sup>21</sup>

El mecanismo responsable de la expansión de los trinucleótidos repetidos es desconocido, sin embargo, se han sugerido diferentes hipótesis como el "deslizamiento" de la ADN polimerasa sobre la horquilla de replicación de ADN o defectos en la maquinaria de recombinación del ADN.<sup>22,23</sup>

Existe un grupo de enfermedades causadas por la expansión del trinucleótido CAG que se caracterizan por pérdida neuronal en el cerebro y la espina dorsal. Dentro de este grupo de desórdenes se encuentra la enfermedad de Huntington, la distrofia miotónica, la atrofia muscular espinobulbar y los diferentes tipos de ataxia espinocerebelosa.<sup>21</sup> Las ataxias espinocerebelosas son difíciles de diagnosticar clínicamente ya que comparten casi la misma sintomatología, no obstante, la identificación en años recientes de los genes responsables de cada tipo de ataxia ha permitido el desarrollo de métodos de diagnóstico certeros.

En el presente estudio analizamos 66 sujetos pertenecientes a tres familias con diagnóstico clínico de SCA2. La SCA2 es causada por la amplificación del triplete CAG presente en el primer exón del gen de la ataxina-2 por arriba

de 31 repeticiones. Por lo tanto, decidimos amplificar por PCR la región del gen que contiene estos repetidos y determinar la presencia de la mutación. El estudio molecular permitió identificar la amplificación del triplete CAG en un rango patológico (36 a 54 repeticiones) en 15 pacientes pertenecientes a las familias 1 y 2, lo que confirmó el diagnóstico clínico. De manera interesante, no se identificó la amplificación del repetido CAG del gen de la ataxina-2 en ningún miembro de la familia 3, a pesar de que los dos pacientes analizados presentaron síntomas clínicos presuntivos de SCA2, incluyendo marcha atáxica, debilidad muscular, fasciculaciones de cara, problemas de lenguaje, oftalmoplejía supranuclear y signos piramidales. Es probable que esta familia esté afectada por otra variedad de SCA, como SCA1 o SCA3, las cuales presentan síntomas muy parecidos a la SCA2.<sup>24-26</sup>

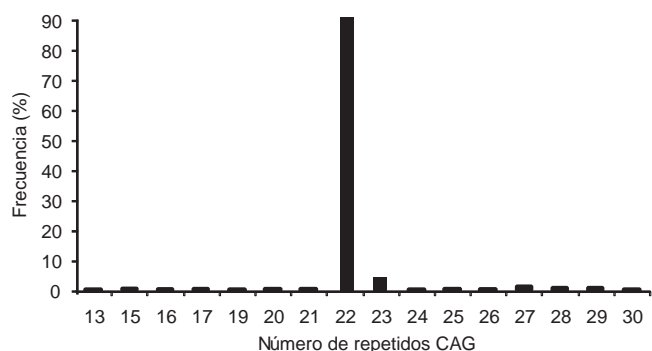
De acuerdo con lo informado en la literatura,<sup>1,9,10,24,25,27</sup> observamos el fenómeno de anticipación en las dos familias afectadas por SCA2, es decir, los pacientes con un mayor número de repetidos CAG tuvieron un inicio más temprano de la enfermedad. En la familia 1, el incremento de 3 a 5 repetidos CAG en los pacientes de la segunda generación ocasionó que el inicio de la enfermedad se adelantara aproximadamente 10 años (de 40 a 30 años) y la presencia de síntomas más severos respecto a los pacientes de la primera generación. De acuerdo con lo anterior se puede predecir que los individuos asintomáticos de la tercera generación que presentan un rango de edad de 11 a 16 años y portan entre 40 y 42 repetidos, empiecen a desarrollar la sintomatología de SCA2 al inicio de la tercera década de vida

**Cuadro II.** Comparación del número de repetidos CAG del gen de la ataxina-2 en diferentes poblaciones

Población	Mexicana	Europea*	Africana*	India*	Asia del Este*
Promedio de repetidos	22.12	22.27	22.28	22.17	21.89
Varianza de repetidos	1.24	1.13	1.61	1.16	0.93
Rango	13-30	18-29	14-29	18-30	15-32
Tamaño de muestra (n)	400	355	300	200	359

El promedio, la varianza y el rango fueron calculados con base en la distribución alélica. Datos informados en la referencia<sup>18</sup>.





**Figura 4.** Distribución alélica de los repetidos CAG del gen de la ataxina-2 en población mexicana.

(Figura 3). En el caso de la familia 2, los pacientes presentaron alelos mutantes con un número de repetidos CAG alrededor de 50 y un inicio de la enfermedad en la adolescencia, lo que corresponde con lo informado para otras poblaciones.<sup>1,27</sup> Cabe mencionar que aunque el número de repetidos determina aproximadamente la edad de inicio de la SCA2, se ha observado que ésta puede variar entre dos y cuatro años dependiendo de la variabilidad individual.<sup>1,25</sup> Sin embargo, no se han identificado genes modificadores o factores epigenéticos para la SCA2, como en otras patologías asociadas con repetidos CAG.<sup>28,29</sup>

La práctica del diagnóstico molecular de la SCA2 en individuos asintomáticos o incluso en etapa prenatal, sería de gran ayuda para la toma oportuna de decisiones médicas sobre su tratamiento, como el asesoramiento genético<sup>8,30</sup> y el uso de fármacos que aminoran algunos de los síntomas de la enfermedad.<sup>4</sup>

A pesar de que encontramos 16 alelos diferentes del repetido CAG del gen de la ataxina-2 en la población mexicana, existe poca variabilidad ya que el alelo de 22 repetidos tuvo una frecuencia de 90.8% (Figura 4). La distribución alélica de los repetidos CAG en la población mexicana fue similar a la reportada para otras poblaciones (Cuadro II), lo que indica poca divergencia evolutiva de este locus entre los diferentes grupos poblacionales.

Este trabajo puso de manifiesto la importancia de confirmar el diagnóstico clínico de la SCA2 mediante la identificación de la expansión del triplete CAG, con el fin de ofrecer un diagnóstico certero y oportuno de la enfermedad.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Leonora Casas su apoyo para la realización de este estudio.

## Referencias

1. Saleem Q, Choudhry S, Mukerji M, Bashyam L, Padma MV, Chakravarthy A, et al. Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: High frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation. *Hum Genet* 2000;106:179-187.

2. Harding AE. The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the drew family of Walworth. *Brain* 1982;105:1-28.
3. Manto MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 2005;4:2-6.
4. Brusse E, Maat-Kievit JA, van Swieten JC. Diagnosis and management of early- and late-onset cerebellar ataxia. *Clin Genet* 2007;71:12-24.
5. Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, et al. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 2000;26:191-194.
6. Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, et al. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 1999;21:379-384.
7. Stevanin G, Durr A, Brice A. Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: From genotype to phenotype and physiopathology. *Eur J Hum Genet* 2000;8:4-18.
8. Tan EK, Ashisawa T. Genetic testing in spinocerebellar ataxias: Defining a clinical role. *Arch Neurol* 2001;58:191-195.
9. Sinha KK, Worth PF, Jha DK, Sinha S, Stinton VJ, Davis MB, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in Eastern India. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:448-452.
10. Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, et al. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: Mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 255 Italian families. *Arch Neurol* 2004;61:727-733.
11. Sahba S, Nechiporuk A, Figueroa KP, Nechiporuk T, Pulst SM. Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1. *Genomics* 1998;47:359-364.
12. Lastres-Becker I, Brodesser S, Lütjohann D, Azizov M, Buchmann J, Hintermann E, et al. Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Genet* 2008;17:1465-1481.
13. Fernández M, McClain ME, Martínez RA, Snow K, Lipe H, Ravits J, et al. Late-onset SCA2:33 CAG repeats are sufficient to cause disease. *Neurology* 2000;55:569-572.
14. Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, et al. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 1996;14:269-276.
15. Pulst SM. Spinocerebellar ataxia type 2. Gene clinics: Clinical genetic information resource [data base online]. University of Washington, Seattle. Available at <http://www.geneclinics.org/profiles/sca2>
16. Dorschner MO, Barden D, Stephens K. Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn* 2002;4:108-113.
17. Krishna N, Mohan S, Yashavantha BS, Rammurthy A, Kiran Kumar HB, Mittal U, et al. SCA1, SCA2 & SCA3/MJD mutations in ataxia syndromes in Southern India. *Indian J Med Res* 2007;126:465-470.
18. Andrés AM, Lao O, Soldevila M, Calafell F, Bertranpetit J. Dynamics of CAG repeat loci revealed by the analysis of their variability. *Hum Mut* 2002;21:61-70.
19. Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, Mader C, Ochoa A, Yescas P, et al. Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord* 2007;22:1050-1053.
20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning; A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
21. Timchenko LT, Caskey CT. Triplet repeat disorders: discussion of molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1432-1447.
22. Brahmachari SK, Meera G, Sarkar PS, Balagurumoorthy P, Tripathi J, Raghavan S, et al. Simple repetitive sequences in the genome: Structure and functional significance. *Electrophoresis* 1995;16:1705-1714.
23. Mc Murray CT. Mechanism of DNA expansion. *Chromosoma* 1995;104:2-13.
24. Cancel G, Durr A, Didierjean O, Imbert G, Burk K, Lezin A, et al. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: A study of 32 families. *Hum Mol Genet* 1997;6:709-715.
25. Gesschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, Treiman LJ, Pulst SM. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 1997;60:842-850.
26. Sasaki H, Yabe I, Tashiro K. The hereditary spinocerebellar ataxias in Japan. *Cytogenet Genome Res* 2003;100:198-205.
27. Giunti P, Sabbadini G, Sweeney MG, Davis MB, Veneziano L, Mantuano E, et al. The role of SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families: Frequency, clinical and genetics correlates. *Brain* 1998;121:459-467.
28. Telenius H, Almqvist E, Kremer B, Spence N, Squitieri F, Nichol K, et al. Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)n changes in Huntington disease. *Hum Mol Genet* 1995;4:189-195.
29. Ueno S, Kondoh K, Kotani Y, Komure O, Kuno S, Kawai J, et al. Somatic mosaicism of CAG repeat in dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Hum Mol Genet* 1995;4:663-666.
30. Nance MA. Genetic testing in inherited ataxias. *Semin Pediatr Neurol* 2003;10:223-231.