

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA BARRETO TENÓRIO

RENDIMENTO DIAGNÓSTICO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO
PARA DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE ATAXIAS HEREDITÁRIAS: REVISÃO
SISTEMÁTICA

CURITIBA

2022

RENATA BARRETO TENÓRIO

RENDIMENTO DIAGNÓSTICO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO
PARA DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE ATAXIAS HEREDITÁRIAS: REVISÃO
SISTEMÁTICA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Helio Afonso Ghizoni Teive

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Choma Bettega Almeida

CURITIBA

2022

Ficha catalográfica

T312

Tenório, Renata Barreto

Rendimento diagnóstico de sequenciamento de nova geração para diagnóstico etiológico de ataxias hereditárias: revisão sistemática [recurso eletrônico] / Renata Barreto Tenório. – Curitiba, 2023.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Helio Afonso Ghizoni Teive
Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Choma Bettega Almeida

1. Ataxia. 2. Degenerações espinocerebelares.
3. Exoma. 4. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 5. Genoma. I. Teive, Helio Afonso Ghizoni.
II. Almeida, Claudia Choma Bettega. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFP
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991

Termo de Aprovação



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **RENATA BARRETO TENORIO** intitulada: "**RENDIMENTO DIAGNÓSTICO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE ATAXIAS HEREDITÁRIAS: REVISÃO SISTEMÁTICA.**", sob orientação do Prof. Dr. HÉLIO AFONSO GHIZONI TEIVE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Janeiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

21/01/2022 10:01:36.0

HÉLIO AFONSO GHIZONI TEIVE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/01/2022 16:55:45.0

ELAINE LUSTOSA MENDES

Avaliador Externo (COMPLEXO HOSPITAL DE CLÍNICAS - CHC-UFPR)

Assinatura Eletrônica

26/01/2022 12:14:18.0

WALTER OLESCHKO ARRUDA

Avaliador Externo (PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE - UFPR)

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 143187

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 143187

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador e à coorientadora pelos ensinamentos e pela paciência. Agradeço às minhas duas filhas que nasceram durante o mestrado e tiveram sempre paciência, mesmo sem compreender o sacrifício que estávamos fazendo. Agradeço ao Vinícius que é marido, melhor amigo, parceiro e, acima de tudo, um exemplo a ser seguido. Agradeço imensamente ao programa de pós-graduação, à Universidade Federal do Paraná, aos colegas de mestrado.

RESUMO

As ataxias hereditárias possuem enorme variabilidade genética e fenotípica. Há mais de 100 doenças que se enquadram neste grupo, com todos os padrões de herança mendeliano e herança mitocondrial. Por serem tão heterogêneas, o diagnóstico de uma ataxia hereditária pode se transformar em uma odisséia. Os métodos que utilizam o sequenciamento de nova geração (especialmente sequenciamento completo do exoma, sequenciamento completo do genoma e painel de genes) têm mudado os paradigmas e o fluxo diagnóstico destas doenças. O rendimento diagnóstico é uma excelente forma de avaliar a utilidade destes exames moleculares. Ele nos diz, em suma, qual é a capacidade que o teste genético tem de concluir o diagnóstico etiológico do indivíduo testado. Esta informação é importante para a tomada de decisão clínica e para o aconselhamento genético pré teste. Visando avaliar o rendimento diagnóstico do sequenciamento de nova geração para o diagnóstico de ataxias hereditárias, foi realizada uma revisão sistemática da literatura. O foco deste estudo foram as ataxias com padrão de herança mendeliano. A estratégia de busca foi ampla e realizada por dois revisores independentes, e buscou estudos que descrevessem o uso do sequenciamento de nova geração para o diagnóstico de ataxias hereditárias. Publicações em inglês e português publicadas entre 2010 e 2021 nas bases EMBASE, Pubmed e Scopus foram incluídas. A busca gerou um total de 1.371 publicações não duplicadas. Destas, 1.254 foram excluídas após leitura de título e resumo e 117 foram lidas integralmente para análise de elegibilidade. Um total de 54 publicações foram selecionadas para extração de dados. O rendimento diagnóstico variou de 6% e 78%, sendo a média de 34,8% e a mediana de 29,5%. Os fatores associados a um maior rendimento diagnóstico foram o uso do sequenciamento do exoma, teste na população pediátrica, ataxia episódica, população com alta consanguinidade e história familiar positiva para ataxia.

Palavras-chave: Ataxia. Ataxia Hereditária. Sequenciamento de Nova Geração. Exoma. Genoma. Painel de Genes. Rendimento Diagnóstico.

ABSTRACT

Hereditary ataxias have enormous genetic and phenotypic variability. There are more than 100 diseases that fall into this group, with all patterns of mendelian inheritance and mitochondrial inheritance. Because they are so heterogeneous, the diagnosis of hereditary ataxia can become an odyssey. The methods that use next generation sequencing (especially whole exome sequencing, whole genome sequencing and gene panel) have changed the paradigms and the diagnostic flow of these diseases. The diagnostic yield is an excellent way to assess the usefulness of these molecular tests. It tells us, in short, what is the ability that genetic testing has to complete the etiological diagnosis of the individual tested. This information is important for clinical decision making and for pre-test genetic counseling. In order to evaluate the diagnostic performance of the new generation sequencing for the diagnosis of hereditary ataxias, a systematic literature review was performed. The focus of this study were ataxias with a Mendelian pattern of inheritance. The search strategy was broad and performed by two independent reviewers, and sought studies that described the use of next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary ataxias. Publications in English, French, Spanish and Portuguese published between 2010 and 2021 in the EMBASE, Pubmed and Scopus databases were included. The search generated a total of 1,371 non-duplicated publications. Of these, 1,254 were excluded after reading the title and abstract and 117 were fully read for eligibility analysis. A total of 54 publications were selected for data extraction. The diagnostic yield ranged from 6% to 78%, with a mean of 34.8% and a median of 29.5%. Factors associated with a higher diagnostic yield were the use of exome sequencing, testing in the pediatric population, episodic ataxia, population with high consanguinity, and a positive family history of ataxia.

Keywords: Ataxia. Hereditary Ataxia. Next Generation Sequence. Exome. Genome Gene Panel. Diagnostic Yield.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AVANÇO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ATAXIAS HEREDITÁRIAS	31
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS DE ATAXIAS CONFORME MODO DE INÍCIO DOS SINTOMAS	19
TABELA 2 -	ATAXIAS DOMINANTES NÃO ASSOCIADAS ÀS EXPANSÕES REPETIDAS	21
TABELA 3 -	ATAXIAS RECESSIVAS.....	22
TABELA 4 -	ATAXIAS LIGADAS AO X	26
TABELA 5 -	ATAXIAS ESPÁSTICAS	27
TABELA 6 -	DIAGRAMA PICO.	33

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACLX	- Ataxias Cerebelares Ligadas ao X
AE	- Ataxias Episódicas
AEAD	- Ataxias Espinocerebelares Autossômicas Dominantes
AEAR	- Ataxias Espinocerebelares Autossômicas Recessivas
AH	- Ataxias Hereditárias
AR	- Autossômico Recessivo / AD: Autossômico Dominante/ XL: Ligado ao X
CNV	- Variação no Número de Cópias (do inglês copy number variation)
EUA	- Estados Unidos da América
FRDA	- Ataxia de Friedreich
HF	- História Familiar
INDELS	- Pequenas Inserções e Deleções em Regiões Codificantes
ND	- Não Disponível
nDNA	- DNA Nuclear
NGS	- Sequenciamento de Nova Geração (NGS - do inglês <i>Next Generation Sequencing</i>)
mtDNA	- DNA mitocondrial
PB	- Pares de Bases
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase chain reaction)
PG	- Pannel de Genes
RD	- Rendimento Diagnóstico
SCA	- Ataxia Espinocerebelar (do inglês, spinocerebellar ataxia)
SE	- Sequenciamento do Exoma
SG	- Sequenciamento do Genoma
SNV	- Variantes de Nucleotídeos Únicos (do inglês single nucleotide variants);
VUS	- Variantes de Significado Incerto (do inglês variant of unknown significance)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA	16
1.2	OBJETIVOS	17
1.2.1	Objetivo geral	17
1.2.2	Objetivos específicos	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.3	ATAXIAS ADQUIRIDAS	19
2.4	ATAXIAS HEREDITÁRIAS	19
2.5	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	28
2.6	DIAGNÓSTICO DAS ATAXIAS HEREDITÁRIAS	30
2.7	RENDIMENTO DIAGNÓSTICO	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	TIPO DE ESTUDO	33
3.1.1	QUESTÃO DO ESTUDO	33
3.1.2	ESTRATÉGIA DE BUSCA	33
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	35
3.3	AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DOS ESTUDOS PRIMÁRIOS	36
3.4	EXTRAÇÃO DOS DADOS	37
4.	RESULTADOS	38
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

As ataxias hereditárias (AH) formam um grupo heterogêneo nos aspectos genéticos, no padrão de herança, nas manifestações clínicas e na fisiopatologia. Em comum, elas cursam com ataxia que resulta de disfunção cerebelar, sensitiva, ou da combinação das duas. Por haver extensa sobreposição fenotípica, o diagnóstico definitivo de uma paciente com ataxia hereditária pode ser um grande desafio. Quase sempre, o diagnóstico molecular é necessário; para tal, lança-se mão dos testes moleculares. Após a exclusão das ataxias hereditárias mais comuns, quase todas causadas por expansões de nucleotídeos repetidos (por exemplo, as expansões CAG que causam as síndromes de poliglutaminas), o sequenciamento de nova geração é bastante utilizado na investigação etiológica (RUANO, 2014).

O advento tecnológico tem contribuído para a ampliação no uso destes testes, tornando-os mais acessíveis na prática clínica. As revisões sistemáticas sobre o rendimento diagnóstico (RD) destes exames para a definição etiológica são importantes para o processo de tomada de decisões a fim de definir o perfil de paciente e o exame com melhor capacidade diagnóstica. Além disso, o RD qualifica o processo de aconselhamento genético e permite fornecer informações de melhor qualidade e precisão.

Este estudo realizou uma revisão sistemática da literatura sobre o rendimento diagnóstico (RD) de painel de genes (PG), sequenciamento do exoma (SE) e sequenciamento do genoma (SG), para ataxias hereditárias. O objetivo geral foi identificar os dados publicados em estudos primários sobre o rendimento diagnóstico de sequenciamento de nova geração para o diagnóstico etiológico de ataxias hereditárias. Os demais objetivos foram identificar os fatores associados a rendimentos diagnósticos maiores ou menores.

1.1 JUSTIFICATIVA

As ataxias hereditárias representam um desafio diagnóstico na prática médica, muitas vezes uma odisseia diagnóstica. O sequenciamento de nova geração, que vem se tornando cada vez mais presente na prática clínica, é indicado para as ataxias hereditárias quando a causa mais comum - as expansões repetidas - foram excluídas. O rendimento diagnóstico é uma excelente medida de performance dos

testes moleculares e é um ponto chave na tomada de decisão clínica. Além disso, informar o rendimento diagnóstico ao paciente como parte do aconselhamento genético pré teste é vantajoso para manter as expectativas do paciente em acordo com os potenciais resultados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Identificar os dados publicados em estudos primários sobre o rendimento diagnóstico de sequenciamento de nova geração para o diagnóstico etiológico de ataxias hereditárias.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar os subgrupos (conforme padrão de herança da ataxia hereditária) com maior e menor rendimento diagnóstico.
- Comparar o rendimento diagnóstico para as diferentes técnicas de sequenciamento de nova geração (exoma, genoma, painel de genes).
- Identificar os subgrupos (conforme o fenótipo clínico) com maior e menor rendimento diagnóstico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O termo ataxia vem do grego, do qual se traduz "falta de ordem". Ataxia designa uma característica irregular do movimento ou da postura. Sua fenomenologia pode ser cerebelar - quando causada por distúrbio cerebelar ou envolvimento cerebelar e extra-cerebelar concomitante; ou aferente - quando causada por perda de sensibilidade proprioceptiva. Sua etiologia pode ser esporádica (não genética) ou hereditária (com herança mendeliana ou mitocondrial).

A ataxia aferente está associada à perda de sensibilidade proprioceptiva, causada por neuropatias graves ou lesões da coluna posterior da medula espinhal que acometem grandes fibras espinocerebelares aferentes. Clinicamente, ela se distingue das demais ataxias por perda de propriocepção especialmente em articulações distais, ausência de disartria e nistagmo, ausência dos reflexos tendinosos profundos, e pelos efeitos corretivos da visão para manutenção do equilíbrio (ROPPER; SAMUELS, 2014).

A ataxia cerebelar, que será o foco deste estudo, está relacionada a doenças que acometem o sistema cerebelar. O cerebelo é responsável pela coordenação dos movimentos - especialmente movimentos refinados voluntários - controle da postura e da marcha, e pela regulação do tônus muscular (ROPPER; SAMUELS, 2014). Os sinais clínicos da ataxia cerebelar são geralmente evidentes e são similares àqueles observados em estado de intoxicação alcoólica. Tipicamente o doente pode apresentar ataxia postural e de marcha; distúrbio oculomotor (nistagmo, alteração de movimentos sacádicos, de fixação do olhar, de movimentação ocular no acompanhamento de objetos, de reflexos oculares); déficits na fala (disartria e mutismo cerebelar); distúrbios de motricidade dos membros (dismetria, tremor cinético ou de ação, disdiadococinesia, decomposição de movimentos, disritmocinesia); déficits cognitivos (funções executivas, fluência verbal, impulsividade); disautonomia (resposta vasomotora anormal a movimentos voluntários) (CAMPBELL, 2005; GIOCONDO; CURCIO, 2018; PANDOLFO; MANTO, 2013; ROPPER; SAMUELS, 2014).

As ataxias cerebelares costumam ser generalizadas, ou seja, afetam membros, marcha e fala. O modo de início dos sintomas é o principal fator a se

considerar para definição da etiologia, como resumido da TABELA 1 (ROPPER; SAMUELS, 2014).

TABELA 1- DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS DE ATAXIAS CONFORME MODO DE INÍCIO DOS SINTOMAS

Modo de início dos sintomas	Principais diagnósticos diferenciais
Início agudo (dias)	Intoxicação por álcool, intoxicação medicamentosa; hiperamonemia; encefalites virais.
Início subagudo (semanas)	Tumores cerebrais; síndrome paraneoplásica; esclerose múltipla; doença de Whipple; doença de Creutzfeldt-Jakob.
Início crônico (meses a anos)	Ataxias hereditárias; síndrome do X-frágil; doenças metabólicas hereditárias.

FONTE: Adaptado de Ropper (2014)

2.3 ATAXIAS ADQUIRIDAS

Ataxias adquiridas (ou esporádicas) são aquelas em que há ausência de uma base genética clara. Podem ser auto-imunes (síndromes paraneoplásicas, ataxia por glúten, ataxia anti-GAD), tóxicas (por anticonvulsivantes, por drogas psiquiátricas), infecciosas (cerebelites agudas), associadas a deficiências vitamínicas (vitamina B12, vitamina B1), associadas a doença vascular, fenótipo cerebelar da atrofia de múltiplos sistemas. O início dos sintomas é quase sempre agudo ou subagudo, a progressão é rápida e não há recorrência familiar; isso as distingue das ataxias hereditárias. O reconhecimento e definição etiológica das ataxias adquiridas é fundamental por haver tratamento para muitas delas (ASHIZAWA; XIA, 2016; NACHBAUER; EIGENTLER; BOESCH, 2015; PALMA; NORCLIFFE-KAUFMANN; KAUFMANN, 2018).

2.4 ATAXIAS HEREDITÁRIAS

Ataxias hereditárias são aquelas com herança mendeliana ou mitocondrial que tem como principal fenótipo a ataxia. Elas formam um grupo heterogêneo nos aspectos genéticos e clínicos. Neste grupo de doenças, há diversos padrões de herança, há doenças congênitas e há doenças que se manifestam tardiamente, há

doenças com progressão relativamente rápida e outras com evolução lenta. Há ataxias hereditárias chamadas "puras", nas quais todas as manifestações clínicas são associadas ao acometimento cerebelar; e há aquelas com diversos achados extra-cerebelares, como demência, oftalmoplegia, espasticidade, microcefalia, retinopatia, coréia, epilepsia, entre outros.

Há ataxias hereditárias chamadas "puras", nas quais todas as manifestações clínicas são associadas ao acometimento cerebelar; e há aquelas com diversos achados extra-cerebelares, como demência, oftalmoplegia, espasticidade, microcefalia, retinopatia, coréia, epilepsia, entre outros. Há, ainda, doenças genéticas com fenótipo extremamente complexo que, eventualmente, tem na ataxia uma de suas manifestações. Estas doenças não são classicamente chamadas de ataxias hereditárias.

A prevalência global das AEAD é, na média, 2,7/100.000, sendo a SCA3 a mais frequente no Brasil e no mundo. A prevalência média das AEAR é 3,3/100.000. (RUANO et al., 2014; TEIVE et al., 2019).

O diagnóstico das ataxias hereditárias requer a exclusão de causas adquiridas de ataxia - especialmente quando não há recorrência familiar evidente - e a detecção de uma ou mais variantes patogênicas em genes associados ao fenótipo; a história familiar pode ser clara, quando há outros familiares afetados; mas não raramente há casos isolados (JAYADEV; BIRD, 2013; PANDOLFO; MANTO, 2013).

Ataxia dominantes são aquelas com padrão de herança autossômico dominante. Elas podem ser ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes (AEAD) ou ataxias episódicas (AE).

O termo SCA vem do inglês "spinocerebellar ataxias". Se refere às AEAD e tem mais de 40 subtipos descritos até hoje (SUN et al., 2016). As AEAD são classificadas de acordo com a apresentação clínica e a nosologia genética. Em 28 AEADs os genes já foram reconhecidos. (PANDOLFO; MANTO, 2013).

As ataxias episódicas (AE) se caracterizam por períodos curtos de ataxia de marcha, nistagmo ou disartria. O quadro pode ser tornar contínuo com a progressão da doença (CHOI; CHOI, 2016).

A maior parte das ataxias dominantes inicia na vida adulta e tem progressão lenta. As formas mais comuns de ataxias dominantes são causadas por expansões repetidas no DNA, especialmente repetições CAG, um códon que codifica a glutamina e dá a este grupo de doenças o nome de poliglutaminas; isto leva ao

ganho de função tóxica que expande proteínas e previne sua degradação, mudam a expressão, a função e interação com outros genes. (SANDFORD; BURMEISTER, 2014).

As expansões repetidas são as bases moleculares mais comuns das ataxias dominantes, mas não são as únicas. Variantes patogênicas convencionais - como mutações de ponto, deleções e inserções - são associadas a diversas AEADs, como a SCA5, SCA13, SCA14, SCA27, SCA28, SCA31 e SCA36 (MONDAL et al., 2013; PANDOLFO; MANTO, 2013; SANDFORD; BURMEISTER, 2014). A tabela 4 lista estas AEADs.

TABELA 2 - ATAXIAS DOMINANTES NÃO ASSOCIADAS ÀS EXPANSÕES REPETIDAS

Doença	Gene
SCA5	<i>SPTBN2</i>
SCA11	<i>TTBK2</i>
SCA13	<i>KCNC3</i>
SCA14	<i>PRKCG</i>
SCA15/29	<i>ITPR1</i>
SCA19	<i>KCND3</i>
SCA20	<i>Duplicação de 260-Kb em 11q12</i>
SCA23	<i>PDYN</i>
SCA27	<i>FGF14</i>
SCA28	<i>AFG3L2</i>
SCA35	<i>TGM6</i>

FONTE: Adaptado de Massimo (2013).

Ataxias recessivas (AEAR) são aquelas ataxias hereditárias com padrão de herança autossômico recessivo. Elas são mais frequentes do que as ataxias dominantes, mas são mais subdiagnosticadas. Por não haver transmissão vertical, casos em que há apenas um afetado na família podem parecer uma ataxia esporádica ou adquirida; além disso, há uma sobreposição fenotípica, um número crescente de entidades e de genes, e as variantes patogênicas muitas vezes são privadas. Diferentemente das ataxias dominantes, as ataxias recessivas costumam se apresentar em idade jovem, podem ser não-progressivas, e quase sempre estão associadas a manifestações extra-cerebelares (BEAUDIN et al., 2017; EMBIRUÇU et al., 2009; SANDFORD; BURMEISTER, 2014).

A ataxia de Friedreich é considerada a mais comum dentre as ataxias recessivas. A prevalência estimada é de 1 em 20-50.000, e parece ser menor no Brasil (ANHEIM et al., 2010; FUSSIGER, 2017; SANDFORD; BURMEISTER, 2014).

Ela é causada por expansões repetidas GAA em homozigose no íntron 1 do gene *FTX* que codifica uma proteína mitocondrial chamada frataxina. A expansão intrônica suprime a expressão gênica, levando à perda de sua função.

As manifestações extra-cerebelares das ataxias recessivas as tornam ainda mais heterogêneas do que as ataxias dominantes. É difícil definir se uma determinada doença pertence ao grupo das ataxias recessivas, ou se é parte de outro grupo de doenças e apresenta ataxia cerebelar em seu fenótipo. Um exemplo é a paraparesia espástica hereditária 11 que pertence ao grupo bem definido de paraparesias espásticas hereditárias e tem ataxia como um dos achados mais proeminentes.

A proposta de Beaudin e colaboradores aloca 45 doenças ao grupo de ataxias recessivas, como mostrado na TABELA 3 (BEAUDIN, 2017).

TABELA 3 - ATAXIAS RECESSIVAS

(Início)

Doença	Gene	Principais manifestações extra-cerebeares
CTX	<i>CYP27A1</i>	Demência, paresia, xantomas tendíneos, arterosclerose, cataratas, aumento do colestanol, início da infância, atrofia cerebelar, leucodistrofia cerebelar ou cerebral
AVED	<i>TTPA</i>	Retinite pigmentosa, titubeação cervical, baixos níveis séricos de vitamina E, início na adolescência, atrofia da medula espinhal, ausência de atrofia cerebelar
AT	<i>ATM</i>	Telangiectasias, apraxia oculomotora, fotossensibilidade, imunodeficiência, predisposição a câncer, aumento da alfafetoproteína, início na infância, atrofia cerebelar
FRDA	<i>FXN</i>	Sinal de Babinski bilateral, sacadas oculares em ondas quadradas, escoliose, cardiomiopatia hipertrófica, envolvimento sensitivo, início na adolescência, atrofia da medula espinhal, ausência de atrofia cerebelar
ATLD	<i>MRE11</i>	Apraxia oculomotora, início na infância, atrofia cerebelar
ARSACS	<i>SACS</i>	Paraparesia espástica, estrias retinianas, pés cavus, início na infância, atrofia cerebelar anterior e superior, ocasionalmente hipointensidade de sinal em T2 na ponte
AOA1/EAOH	<i>APTX</i>	Apraxia oculomotora, comprometimento cognitivo, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, início na infância, atrofia cerebelar
SCAN1	<i>TDP1</i>	Neuropatia sensorimotora axonal periférica, atrofia muscular distal, hipercolesterolemia, início na adolescência, atrofia cerebelar

(Continua)

Cayman ataxia	<i>ATCAY</i>	Retardo psicomotor, hipotonia, estrabismo, início neonatal, hipoplasia cerebelar
SANDO or MIRAS/SCAE	<i>POLG1</i>	Em SANDO, ataxia sensorial, oftalmoparesia, mioclonia, ptose, início na idade adulta, atrofia cerebelar variável, lesões da substância branca cerebelar, lesões estrogênicas. Em MIRAS, ataxia cerebelar e sensitiva, epilepsia, enxaqueca, mioclonia, início na infância ou adolescência, anormalidades de sinal no cerebelo e tálamo
AOA2	<i>SETX</i>	Polineuropatia, sinais piramidais, apraxia oculomotora, tremor de cabeça, coréia, distonia, elevação de α -fetoproteína, início na adolescência, atrofia cerebelar
CAMRQ1, DES	<i>VLDLR</i>	Ataxia cerebelar não progressiva, retardo mental, hipotonia, estrabismo, marcha quadripedal ocasional, início congênito, hipoplasia cerebelar inferior, simplificação giral cortical
IOSCA/MTDPS7 (Allelic to PEOA3)	<i>C10orf2</i>	Atetose, hipotonia, atrofia óptica, oftalmoplegia, perda auditiva, epilepsia, hipogonadismo, envolvimento hepático, início infantil, atrofia moderada do tronco cerebral e cerebelo com doença avançada
MSS	<i>SIL1</i>	Catarata, retardo mental, miopatia, baixa estatura, início na infância, atrofia cerebelar
DCMA/MGCA5	<i>DNAJC19</i>	Cardiomiopatia dilatada, ataxia cerebelar não progressiva, retardo mental, disgenesia testicular, anemia, aumento do ácido 3-metilglutacônico urinário, início infantil
ARCA1	<i>SYNE1</i>	Ataxia cerebelar pura, comprometimento cognitivo, sinais piramidais ocasionais, início tardio, atrofia cerebelar
ARCA2	<i>ADCK3(CABC1)</i>	Intolerância ao exercício, epilepsia, mioclonia, comprometimento cognitivo, início na infância, atrofia cerebelar, lesões cerebrais pontuais ocasionais
SeSAME syndrome	<i>KCNJ10</i>	Epilepsia, surdez sensorioneural, retardo mental, tubulopatia e desequilíbrio eletrolítico, início infantil, ausência de atrofia cerebelar
CAMRQ3	<i>CA8</i>	Retardo mental leve, marcha quadrupedal ocasional, início congênito, atrofia cerebelar, anormalidades da substância branca
Salih ataxia/SCAR15 (1 family)	<i>KIAA0226</i>	Epilepsia, retardo mental, início na infância, ausência de atrofia cerebelar
PHARC	<i>ABHD12</i>	Neuropatia sensorimotora, catarata, perda auditiva, retinite pigmentosa, início na adolescência, atrofia cerebelar variável
SPAX4 (1 family)	<i>MTPAP</i>	Paraparesia espástica, atrofia óptica, envolvimento cognitivo, início infantil.

(Continua)

ARCA3	<i>ANO10</i>	Comprometimento cognitivo, nistagmo pessimista, início adolescente ou adulto, atrofia cerebelar
SCAR11 (1 family)	<i>SYT14</i>	Retardo psicomotor, início tardio, atrofia cerebelar
CAMRQ2	<i>WDR81</i>	Marcha quadrupedal ocasional, comprometimento cognitivo, início congênito, hipoplasia do cerebelo e corpo caloso
AOA3 (1 family)	<i>PIK3R5</i>	Apraxia oculomotora, envolvimento sensório-motor, início na adolescência, atrofia cerebelar
SCAR13	<i>GRM1</i>	Comprometimento cognitivo, sinais piramidais leves, baixa estatura, convulsões, início congênito, atrofia cerebelar
CAMRQ4 (1 family)	<i>ATP8A2</i>	Comprometimento cognitivo, marcha quadrupedal ocasional, início congênito, atrofia cerebelar e cerebral
SCAR7 (Allelic to CLN2)	<i>TPP1</i>	Sinais piramidais, envolvimento da coluna posterior, tremor, início na infância, atrofia do cerebelo e ponte
Ataxia and hypogonadotropism	<i>RNF216</i>	Hipogonadismo hipogonadotrófico, demência, coreia ocasional, início da infância até o início do adulto jovem, atrofia cerebelar e cerebral
SCAR18	<i>GRID2</i>	Mirada vertical superior tônica, retardo psicomotor, distrofia retiniana, início infantil, atrofia cerebelar
SCAR16	<i>STUB1</i>	Sinais piramidais, neuropatia, hipogonadismo ocasional, idade variável no início, atrofia cerebelar
SCAR12	<i>WWOX</i>	Epilepsiaônico-clônica, retardo mental, espasticidade, início neonatal até a infância, atrofia cerebelar ou cerebral variável
ATLD2 (1 family)	<i>PCNA</i>	Telangiectasias, perda auditiva sensorineural, fotossensibilidade, comprometimento cognitivo, baixa estatura, início na infância, atrofia cerebelar
SCAR20	<i>SNX14</i>	Retardo mental, perda auditiva sensorineural, macrocefalia, dismorfismo, início infantil, atrofia cerebelar
SCAR17	<i>CWF19L1</i>	Retardo mental, início congênito, hipoplasia cerebelar
ACPHD (1 family)	<i>DNAJC3</i>	Diabetes mellitus, sinais de primeiro neurônio motor, neuropatia desmielinizante, perda auditiva neurossensorial, início da infância até o adulto, atrofia generalizada supra e infratentorial

(Continua)

(Término)

LIKNS/SCAR19 (1 family)	<i>SLC9A1</i>	Perda auditiva neurossensorial, início na infância, atrofia vermiana variável
AOA4 (Allelic to MCSZ)	<i>PNKP</i>	Distonia, apraxia oculomotora, polineuropatia, comprometimento cognitivo, início na infância, atrofia cerebelar
SCAR2	<i>PMPCA</i>	Ataxia cerebelar não progressiva, comprometimento cognitivo, sinais piramidais, baixa estatura, início congênito ou infantil, atrofia cerebelar
SCAR21	<i>SCYL1</i>	Insuficiência hepática, neuropatia periférica, comprometimento cognitivo leve, início na infância, atrofia do vermis cerebelar, afinamento do nervo óptico
SCAR22 (1 family)	<i>VWA3B</i>	Comprometimento cognitivo, sinais piramidais, início adulto, atrofia cerebelar e corpo caloso fino
SCAR23 (1 family)	<i>TDP2</i>	Crises tônicas, comprometimento cognitivo, dismorfismo, início na infância
SCAR24 (1 family)	<i>UBA5</i>	Catarata, neuropatia periférica, início na infância, atrofia cerebelar
Cerebellar ataxia with developmental delay (1 family)	<i>THG1L</i>	Retardo psicomotor, sinais piramidais, início na infância, hipoplasia do vermis

 FONTE: Adaptado de Beaudin (2017)

As ataxias cerebelares ligadas ao X (ACLX) são bastante raras, exceto a síndrome do tremor-ataxia do X-frágil. As ACLX cursam com disgenesia cerebelar (hipoplasia, atrofia ou displasia) causada por variantes patogênicas ou por desequilíbrios genômicos no cromossomo X. O fenótipo das ACLX inclui de maneira variável hipotonia, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, ataxia e outros sinais cerebelares (ZANNI; BERTINI, 2018). As ataxias ligadas ao X estão listadas na TABELA 4.

TABELA 4 - ATAXIAS LIGADAS AO X

Doença	Gene Locus	Características
Anemia sideroblástica e ataxia ligada ao X	<i>ABCB7</i>	• Início na infância • Anemia assintomática
Ataxia ligada ao X	<i>ATP2B3</i>	• Início na infância • Hipotonia
Doenças relacionadas ao gene CASK	<i>CASK</i>	• Deficiência intelectual • Microcefalia • Hipotonia • Hipoplasia do nervo ótico
FXTAS Deficiência intelectual ligada ao X, hipoplasia cerebelar e face típica	<i>FMR1</i> <i>OPHN1</i>	• Início na vida adulta • Início na infância • Hipotonia • Atraso do desenvolvimento
Síndrome Christianson	<i>SLC9A6</i>	• epilepsia • início na infância • deficiência intelectual
Ataxia espinocerebelar tipo 5 ligada ao X	Xq25-q27.1	• crises convulsivas - início na infância • hipoplasia cerebelar

FONTE: Adaptado de Bird (2019)

As ataxias espásticas são aquelas ataxias com marcada espasticidade de características piramidais. Um exemplo é a ataxia espástica autossômica recessiva de Charlevoix–Saguenay. Certas paraplegias espásticas, como paraplegia espástica 7, pode se apresentar como um fenótipo atáxico. Devido à raridade e heterogeneidade genética dessas condições, seu diagnóstico molecular permanece desafiador e demorado (BEREZNYAKOVA; DUPRÉ, 2018; BIRD, 2019). A TABELA 5 lista as ataxias espásticas.

Tabela 5 - ATAXIAS ESPÁSTICAS

Doença (herança)	Gene/ Locus	
SPAX1 (AD)	<i>VAMP1</i>	• Espasticidade progressiva inicialmente nas pernas • Ataxia de marcha
SPAX2 (AR)	<i>KIF1C</i>	• Início na infância com tremor e dismetria
SPAX3 (AR)	<i>MARS2</i>	• Alterações em substância branca periventricular
SPAX4 (AR)	<i>MTPAP</i>	• Atrofia ótica
SPAX5 (AR)	<i>AFG3L2</i>	• Neuropatia periférica e epilepsia
SPG7 (AR)	<i>SPG7</i>	• Disfunção vestibular • Atrofia cerebelar

FONTE: Adaptado de Bird (2019)

Por fim, as ataxias mitocondriais são ataxias progressivas frequentemente associadas a variantes patogênicas no DNA mitocondrial (mtDNA); exemplos são MERRF (epilepsia mioclônica com fibras vermelhas irregulares), NARP (neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa) e a síndrome de Kearns-Sayre. As doenças mitocondriais quase sempre têm fenótipo florido e variável; é comum observar convulsões, surdez, diabetes mellitus, cardiomiopatia, retinopatia e baixa estatura (DA POZZO et al., 2009). Além das alterações em mtDNA, há doenças mitocondriais

associadas a variantes patogênicas em genes de DNA nuclear, como o gene *POLG*. Isso ocorre quando os genes nucleares regulam a função mitocondrial (BIRD, 2019).

2.5 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Sequenciamento de nova geração (NGS - do inglês *Next Generation Sequencing*) é um método que sequencia simultaneamente milhões de fragmentos de DNA (ou DNA complementar); isso lhe confere a capacidade de analisar simultaneamente vários genes. O método pode detectar variantes somáticas (adquiridas, por exemplo, em células tumorais) e variantes germinativas (herdadas). Comercialmente, há 3 principais exames que utilizam o NGS: exoma, genoma, e painel de genes. Estes exames, que estão cada vez mais disponíveis e acessíveis na prática clínica, protagonizam uma mudança de paradigma no processo diagnóstico de determinadas doenças, incluindo as ataxias hereditárias. O conhecimento adquirido sobre as bases genéticas de diversas doenças cresceu exponencialmente com o advento do NGS, e praticamente dobrou o número de genes identificados como causadores de doenças monogênicas entre 2007 e 2013. Sendo assim, reconhecemos que o sequenciamento de nova geração impactou o campo da genética humana como um todo, mas poucas áreas se beneficiaram mais do que o estudo de doenças genéticas raras (KOBOLDT et al., 2013; LI et al., 2015; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Há 4 passos técnicos para o sequenciamento de nova geração: as amostras são submetidas à extração do DNA, preparação de biblioteca, enriquecimento da região alvo e sequenciamento. Após, procede-se à interpretação de resultados. Preparar a biblioteca quer dizer preparar o DNA para uso em um sequenciador. O DNA é quebrado em fragmentos e adaptadores são inseridos nas extremidades (regiões flangeadoras). O termo biblioteca refere-se a esses fragmentos de DNA com adaptadores de flangeamento prontos para sequenciamento. A biblioteca resultante sofre enriquecimento para a análise do exoma completo, de painel de genes, ou é sequenciado diretamente para análise do genoma completo. O próximo passo é o sequenciamento, que é geralmente realizado pelos sequenciadores Illumina (San Diego, Califórnia) ou por máquinas Ion Torrent. Os dados brutos são lidos, têm a qualidade analisada, as leituras e variantes são mapeadas e identificadas. Ao final, obtém-se um arquivo chamado *variant call file*. As variantes

obtidas são analisadas para determinar se são patogênicas, provavelmente patogênicas, variantes de significado incerto, benignas ou provavelmente benignas. Preconiza-se o uso dos critérios do colégio americano de genética e genômica e associação de patologia molecular (RICHARDS et al., 2015; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Painel de genes (PG) é um teste em que vários genes são analisados simultaneamente; os painéis são elaborados para um determinado fenótipo; por exemplo, o painel de genes para epilepsias engloba genes conhecidamente associados a este fenótipo. Os painéis são indicados quando há um fenótipo definido, que pode ser explicado por diversos genes; ou seja, quando o fenótipo apresenta heterogeneidade de locus. Comparando à testagem de um único gene, o painel de genes aumenta a sensibilidade analítica e facilita o processo de tomada de decisão dos médicos solicitantes. O número de genes englobados em um painel pode variar significativamente entre diferentes laboratórios. Por exemplo, um painel de epilepsias pode testar de 77 a 377 genes (XUE et al., 2015).

O sequenciamento de exoma completo permite a análise simultânea das regiões codificantes de mais de 20.000 genes - essencialmente, todas as regiões codificantes em exons no genoma humano. Por ser um teste mais amplo do que o PG, o SE costuma ter menor sensibilidade; a cobertura dos genes individuais testados em um painel é, portanto, maior do que o encontrado no SE. Mesmo com NGS e captura híbrida, aproximadamente 5% das bases codificantes não atingem cobertura suficiente para detecção confiável de variantes. Mesmo com uma cobertura adequada, certos tipos de mutações (por exemplo, inversões, duplicações e outras variantes estruturais) permanecem difíceis de detectar - estas limitações são comuns aos demais testes de NGS e são detalhadas a seguir (KOBOLDT et al., 2013; LI et al., 2015; TETREAULT et al., 2015). Além disso, o exoma gera uma enorme quantidade de informações nem sempre fáceis de interpretar; há maior probabilidade de detecção de variantes de significado e variantes incidentais, que podem gerar malefícios diversos ao indivíduo testado.

O sequenciamento de genoma completo detecta variantes em regiões codificantes e não-codificantes, além de variação no número de cópias (CNVs, do inglês *copy number variation*). É o único teste capaz de detectar todos os tipos de variantes genômicas: variantes de nucleotídeos únicos (SNV, do inglês *Single Nucleotide Variants*); pequenas inserções e deleções (INDELS) em regiões

codificantes; variantes em sítio de splicing; variantes intrônicas; fusões gênicas; CNVs. Pelo alto custo e pela enorme quantidade de informações geradas - incluindo variantes incidentais e variantes de significado incerto (VUS, do inglês variant of unknown significance) - seu uso ainda é limitado, e há um grande desafio na interpretação de seus resultados (KOBOLDT et al., 2013; TETREAULT et al., 2015; XUE et al., 2015).

As limitações do NGS são sensibilidade analítica na detecção de mutação, áreas do genoma que são difíceis de sequenciar ou analisar, limitações de conhecimento para interpretar novas ou raras mutações, capacidade limitada para detectar CNVs e integração de informações genômicas no cuidado do paciente. Tanto ES quanto PG não detectam variantes em regiões intrônicas profundas (YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Regiões homólogas (áreas do genoma com sequências de nucleotídeos muito similares), as expansões repetidas (como as repetições CAG) e regiões ricas em GC não são confiavelmente interpretáveis pelas atuais plataformas de NGS e algoritmos padrão de bioinformática (YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

2.6 DIAGNÓSTICO DAS ATAXIAS HEREDITÁRIAS

O mecanismo molecular mais comum de ataxias hereditárias é a expansão repetida. As duas ataxias mais prevalentes mundialmente - SCA3 e FRDA - são causadas por repetições CAG e GAA nos genes *ATX3* e *FXN*, respectivamente. (RUANO et al., 2014). Para a detecção destas expansões repetidas o sequenciamento de nova geração não é o melhor método. O método de escolha é a amplificação e o sequenciamento por reação em cadeia da polimerase (PCR). (MARTORELL et al., 1997). Portanto, embora o NGS ofereça uma estratégia poderosa para procurar genes de doenças mendelianas, ela pode ser falha quando se trata de ataxias hereditárias (KOBOLDT et al., 2013).

Não obstante, o advento do sequenciamento de nova geração permitiu o conhecimento de novos genes associados a ataxia hereditárias; este conhecimento cresceu vertiginosamente, especialmente nos últimos 5 anos. A FIGURA 1 ilustra os avanços (GALATOLO et al., 2018).

FIGURA 1 - AVANÇO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ATAXIAS HEREDITÁRIAS

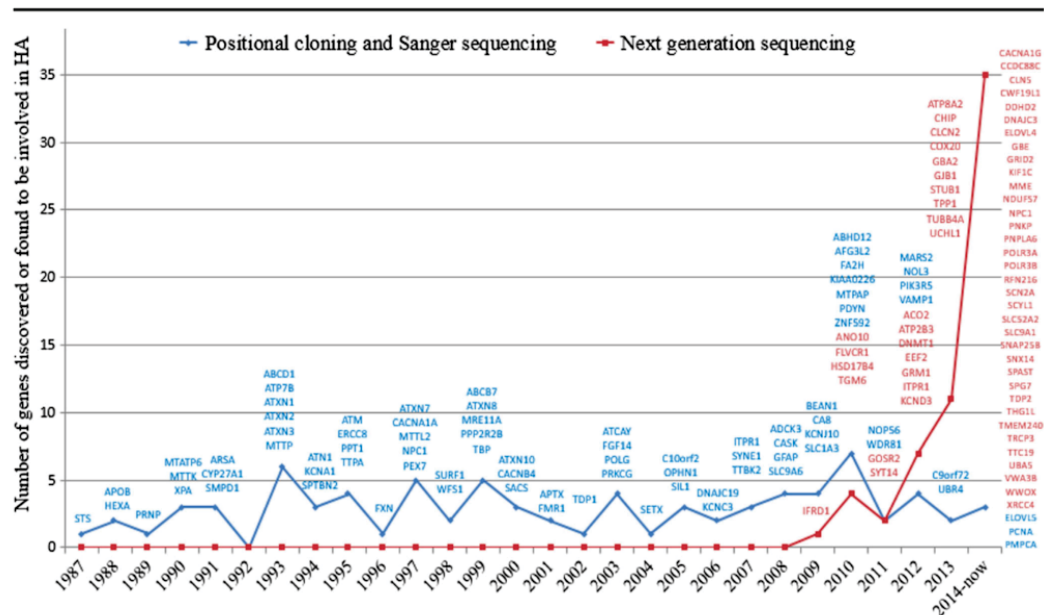


Fig. 1 Timeline of the discovery of genes involved in hereditary spinocerebellar ataxia

FONTE: Retirado de GALATOLO (2018)

Quando há suspeita de ataxia hereditária - seja pela recorrência familiar, pela evolução lenta, por outros comemorativos clínicos - deve-se prosseguir com a compreensão da história médica, exame físico e neurológico, neuroimagem, exclusão de causas adquiridas de ataxia. Devido à extensa sobreposição clínica entre todas as formas de ataxia hereditária, o diagnóstico molecular é imperativo; cabem algumas ressalvas em casos de ataxia com herança AR: o aumento sérico de alfafetoproteína sugere ataxia telangiectasia ou ataxia com apraxia oculomotora tipo 2; níveis séricos baixos de vitamina E sugerem ataxia por deficiência de vitamina E; colestanol elevado sugere xantomatose cerebrotendinosa; albumina baixa sugere ataxia com apraxia oculomotora tipo 1. Mesmo nestes casos, é recomendável o teste molecular para que o diagnóstico seja confirmado.

Considerando que as expansões repetidas de nucleotídeos são relativamente comuns, elas devem ser buscadas pelo método específico, descrito anteriormente. Esta recomendação é válida principalmente para as ataxias dominantes e para suspeita de ataxia de Friedreich. No caso das AEADs, 50-60% dos casos podem ser identificados neste primeiro momento (GALATOLO et al., 2018; JAYADEV; BIRD, 2013). Após a exclusão de expansão repetidas, o próximo passo é o sequenciamento de nova geração.

2.7 RENDIMENTO DIAGNÓSTICO

O rendimento do diagnóstico é a probabilidade de que um teste forneça as informações necessárias para estabelecer um diagnóstico genético. É um conceito definido principalmente do ponto de vista do paciente: o número de pacientes que recebem uma confirmação molecular de um determinado diagnóstico clínico é o principal parâmetro de saída. Weiss e colaboradores propuseram o uso de “rendimento diagnóstico” como um critério de seleção para estabelecer o desempenho de testes baseados em NGS (WEISS et al., 2013). As características intrínsecas do teste genético influenciam o rendimento diagnóstico; por exemplo, um exoma com baixa cobertura para uma determinada região genômica terá uma menor capacidade de confirmação diagnóstica (portanto, um baixo rendimento diagnóstico) se o gene envolvido estiver na região de baixa cobertura. Felizmente, há muitos laboratórios de genética e genômica com creditações internacionais e alta qualidade técnica

Título da seção quaternária

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de uma revisão sistemática da literatura científica desenvolvida conforme as orientações do Instituto Joanna Briggs, uma organização internacional de pesquisa com base na Faculdade de Saúde e Ciências Médicas da Universidade de Adelaide, Australia.

QUESTÃO DO ESTUDO

Esta revisão sistemática buscou responder qual é o rendimento diagnóstico de sequenciamento de nova geração para ataxias hereditárias. A TABELA 6 (diagrama PICO) sintetiza a população, intervenção e desfecho do estudo.

TABELA 6 – DIAGRAMA PICO.

População	Pessoas com suspeita de ataxia hereditária
Intervenção	Sequenciamento de nova geração
Comparação	Não se aplica
Outcome (Desfecho)	Diagnóstico genético

FONTE: O autor (2022).

3.1.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA

A estratégia de busca foi pensada e executada integralmente por duas revisoras independentes: Karina Carvalho Donis é mestre em genética e médica geneticista; atua no setor de neurogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A segunda revisora sou eu, Renata Tenório, médica geneticista.

Inicialmente fizemos um projeto piloto para identificação de estudos que claramente seriam de interesse nesta revisão; a partir destes estudos, formulamos

estratégias de busca que os evitassem incorrer em viés que limitasse a busca e excluísse estudos de interesse. A partir deste estudo piloto foram definidos os termos da busca. Os termos indexados (termos MeSh - Medical Subject Headings) foram identificados no vocabulário estruturado dos Descritores em Ciências da Saúde (<https://decs.bvsalud.org/>).

Utilizamos três bancos de dados: EMBASE, Pubmed e Scopus. A pesquisa selecionou trabalhos publicados em inglês e português e o período foi de junho de 2010 até fevereiro de 2021, quando a revisão foi publicada no PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*). O código de identificação no PROSPERO é 123868. A busca foi ampla e incluiu ataxias e doenças neurológicas. O objetivo foi encontrar estudos que descrevessem o uso de sequenciamento de nova geração para o diagnóstico de ataxias hereditárias.

A estratégia de busca utilizada na base de dados EMBASE foi: ('cerebellar ataxia'/exp OR 'ataxia, cerebellar' OR 'ataxia, cerebellum' OR 'cerebellar ataxia' OR 'cerebellum ataxia' OR 'congenital cerebellar ataxia' OR 'ataxia'/exp OR 'ataxia' OR 'ataxie') AND ('whole exome sequencing'/exp OR 'exome sequencing' OR 'whole exome sequencing' OR 'genome sequence'/exp OR 'next generation sequencing'/exp OR 'next generation sequencing' OR 'genetic panel' OR 'gene panel' OR 'sequence analysis'/exp OR 'analysis, sequence' OR 'sequence analysis') AND ('diagnostic value'/exp OR 'diagnostic reliability' OR 'diagnostic utility' OR 'diagnostic value' OR 'diagnostic yield' OR 'value, diagnostic' OR 'diagnosis'/exp OR 'diagnosis' OR 'diagnostic screening' OR 'diagnostic screening programs' OR 'diagnostics' OR 'disease diagnosis' OR 'medical diagnosis') AND (2010:py OR 2011:py OR 2012:py OR 2013:py OR 2014:py OR 2015:py OR 2016:py OR 2017:py OR 2018:py OR 2019:py OR 2020:py OR 2021:py) AND 'human'/de AND ('congenital disorder'/lnk OR 'diagnosis'/lnk OR 'etiology'/lnk) AND ('article'/it OR 'article in press'/it) AND ([english]/lim OR [portuguese]/lim) AND ([article]/lim OR [article in press]/lim) AND ([embase]/lim OR [medline]/lim) AND [medline]/lim

A estratégia de busca utilizada na base de dados Pubmed foi: ("Cerebellar Ataxia" OR "Spinocerebellar Degenerations" OR ataxia) AND ("Sequence Analysis" OR "Whole Exome Sequencing" OR "Complete Exome Sequencing" OR "Complete Exome Sequencings" OR "Exome Sequencing, Complete" OR "Exome Sequencing, Whole" OR "Exome Sequencings, Complete" OR "Exome Sequencings, Whole" OR "Sequencing, Complete Exome" OR "Whole Genome Sequencing" OR "Genome

Sequencing, Whole" OR "Sequencing, Whole Genome" OR "Complete Genome Sequencing" OR "Genome Sequencing, Complete" OR "Sequencing, Complete Genome" OR "Next-Generation Sequencing" OR "Next Generation Sequencing" OR "genetic panel" OR "targeted panel" OR "gene panel"). The filters used: full text, journal articles, from 1/1/2021 until 2/14/2021, species: humans, language: english and portuguese

A estratégia de busca na base de dados Scopus foi: ("Cerebellar Ataxia" OR "Spinocerebellar Degenerations" OR ataxia) AND ("Sequence Analysis" OR "Whole Exome Sequencing" OR "Complete Exome Sequencing" OR "Complete Exome Sequencings" OR "Exome Sequencing, Complete" OR "Exome Sequencing, Whole" OR "Exome Sequencings, Complete" OR "Exome Sequencings, Whole" OR "Sequencing, Complete Exome" OR "Whole Genome Sequencing" OR "Genome Sequencing, Whole" OR "Sequencing, Whole Genome" OR "Complete Genome Sequencing" OR "Genome Sequencing, Complete" OR "Sequencing, Complete Genome" OR "Next-Generation Sequencing" OR "Next Generation Sequencing" OR "genetic panel" OR "targeted panel" OR "gene panel") AND ("diagnosis") AND (LIMIT-TO (SRCTYPE , "j")) AND (LIMIT-TO (PUBSTAGE , "final") OR LIMIT-TO (PUBSTAGE , "aip")) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar")) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "MEDI")) AND (LIMIT-TO (PUBYEAR , 2021) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2020) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2019) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2018) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2017) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2016) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2015) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2013) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2012) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2011) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2010)) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE , "English")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Article") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Human") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Genetics"))

Foi realizada uma busca manual por artigos relevantes. A busca se deu nas referências bibliográficas de artigos relevantes.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Nosso objetivo foi revisar o rendimento diagnóstico do sequenciamento de nova geração na identificação da etiologia molecular da ataxia hereditária. Para

tanto, selecionamos todos os estudos de acurácia, coorte, caso-controle ou série de casos que descreviam o uso de painéis genéticos, sequenciamento completo do exoma e sequenciamento total do genoma em pacientes de todas as idades com suspeita clínica de ataxia hereditária. Avaliamos os artigos de uma perspectiva clínica para determinar se a ataxia era uma característica proeminente nos pacientes relatados, ou se era um achado secundário em outras doenças do movimento ou multissistêmicas; apenas os casos com ataxia como característica proeminente foram incluídos nesta revisão. Uma lista detalhada das doenças que foram consideradas ataxia hereditária será listada quando concluirmos a extração dos dados.

Os critérios de exclusão foram: artigos de revisão, estudos de genes candidatos (em contexto de pesquisa e análise de segregação), artigos em que o fenótipo principal não era ataxia, artigos em que o fenótipo ou os resultados foram pouco descritos, artigos que analisaram genes únicos, estudos em animais, conhecimento prévio de uma mutação genética ou mutação familiar, estudos que não avaliaram o DNA nuclear; e estudos que incluíram menos de 6 pacientes não aparentados com ataxia.

3.3 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DOS ESTUDOS PRIMÁRIOS

A qualidade dos estudos primários foi avaliada pela análise de itens selecionados que foram adicionados à tabela estruturada de extração de dados; utilizamos como base a proposta do Instituto Joanna Briggs para avaliação de qualidade de série de casos. Os itens avaliados foram: critérios de inclusão e exclusão colocados de maneira clara; aferição padronizada e confiável de ataxia para todos os participantes; inclusão dos participantes de forma consecutiva; pacientes com ataxia descritos separadamente daqueles com outras doenças neurológicas; probandos descritos separadamente; clareza sobre qual teste de NGS foi feito para cada participante; a publicação descreve fenótipos mistos (ataxia e outras doenças neurológicas); a clareza de informações clínicas de todos os pacientes com ataxia que fizeram testes de NGS; a clareza de informações clínicas de todos os pacientes que obtiveram um diagnóstico com testes NGS; descrição da lógica na classificação de variantes; e descrição da lógica na seleção dos genes que foram testados em painéis genéticos.

3.4 EXTRAÇÃO DOS DADOS

Uma planilha padronizada para extração de dados dos artigos relevantes foi pensada e executada por dois revisores independentes. Ali Hassan é médico geneticista e mestrando em genética na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A segunda revisora sou eu, Renata Tenório, médica geneticista.

Os dados extraídos foram: autores, título, ano e país de publicação; número de pacientes com ataxia que fizeram testes NGS, resultados positivos e rendimento diagnóstico; quantidade de VUS detectadas; exclusão prévia de expansões repetidas e/ou causas adquiridas de ataxias; idade de início da ataxia; recorrência familiar; sintomas associados ou ataxia pura; progressão da ataxia; teste NGS realizado e, quando painel, o número de genes testados; gênero dos participantes; plataforma utilizada no sequenciamento.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos levaram à produção do artigo que respondem ao objetivo geral e específicos. Submetido, aceito e publicado (DOI : 10.1007/s12311-023-01629-y) pela revista científica *The Cerebellum* em periódico indexado ao Qualis A2 na área de concentração vinculado ao Programa.

Diagnostic yield of NGS tests for hereditary ataxia: a systematic review

Running title – NGS for Ataxias

Renata Barreto Tenorio, MD 1 genetica.curitiba@gmail.com

Carlos Henrique F. Camargo, MD, PhD, FAAN 1 chcamargo@uol.com.br

Karina Carvalho Donis, MD, PhD 2 kcdonis@hcpa.edu.br

Claudia Choma Betttega Almeida, PhD 3 chomac@ufpr.br

Hélio A.G. Teive, MD, PhD1,4 hagteive@mps.com.br

Neurological Diseases Group, Postgraduate Program in Internal Medicine, Internal Medicine Department, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Genetics Research Group, Hospital de Clínicas, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Department of Nutrition, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Movement Disorders Sector, Neurology Service, Internal Medicine Department, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Corresponding author: Renata Barreto Tenorio. Address: Av dos Estados, 1007, Curitiba - PR, 80610-040 genetica.curitiba@gmail.com

Words – 4902

Tables – 3

Figures - 3

Abstract

Background: Next-generation sequencing (NGS), comprising targeted panels (TP), exome sequencing (ES), and genome sequencing (GS), became robust clinical tools for diagnosing hereditary ataxia (HA). Determining their diagnostic yield (DY) is crucial for optimal clinical decision-making. We conducted a comprehensive systematic literature review on the DY of NGS tests for HA. **Methods:** We searched Pubmed and Embase databases for relevant studies between 2016 and 2022 and manually examined reference lists of relevant reviews. Eligible studies described the DY of NGS tests in patients with ataxia as a significant feature. **Results:** Data from 33 eligible studies showed a median DY of 43% (IQR = 9.5 - 100%). The median DY for TP and ES were 46% and 41.9%, respectively. Higher DY was associated with specific phenotype selection, such as episodic ataxia at 68.35% and early and late onset of ataxia at 46.4% and 54.4%. Parental consanguinity had a DY of 52.4% ($p=0.009$), and the presumed autosomal recessive (AR) inheritance pattern showed 62.5%. There was a difference between the median DY of studies that performed targeted sequencing (TRE) screening and those that did not ($p=0.047$). A weak inverse correlation was found between DY and the extent of previous genetic investigation ($\rho = -0.323$; $p=0.065$). The most common genes were CACNA1A and SACS. **Conclusion:** DY was higher for presumed AR inheritance pattern, positive family history, and parental consanguinity. ES appears more advantageous due to the inclusion of rare genes that might be excluded in TP.

Keywords: Next-generation sequencing; targeted panels; whole exome sequencing; whole genome sequencing; cerebellar ataxia; spinocerebellar ataxia

Introduction

Hereditary ataxias (HA) present a diagnostic challenge due to their diverse phenotypes and genetic etiologies, which can manifest at any age and exhibit various modes of inheritance patterns. These ataxias are attributed to over 100 different genes and have heterogeneous molecular causes, including tandem repeat expansion (TRE) or single nucleotide variants (SNV) in both nuclear and mitochondrial DNA (mtDNA) [1].

Until the 1990s, the molecular basis of ataxia remained unknown for most affected individuals, leading to uncertain diagnoses after excluding acquired causes of cerebellar ataxia (CA). The discovery of trinucleotide CAG repeat expansion as a common cause of HA led to the identification of novel forms of the disease, and PCR (polymerase chain reaction) became the ideal technique for detecting TRE. The

discovery of trinucleotide CAG repeat expansions as a common cause of HA unveiled new forms of the disease, with PCR becoming the preferred technique for detecting TRE. However, while repeat expansion disorders account for a significant proportion of HA, other forms of the condition are not caused by repeat expansions. Next-generation sequencing (NGS) has emerged as an effective diagnostic tool for this group of non-repeat expansion HA, while PCR is ineffective [2, 3].

NGS tests enable the sequencing of large amounts of DNA quickly, facilitating the detection of a broad range of genetic variants. NGS includes whole-genome sequencing (GS), exome sequencing (ES), and targeted gene panel sequencing (TP), each with its advantages and limitations. TP focuses on analyzing the coding exons of a restricted set of genes. At the same time, ES includes two variants: whole exome sequencing (WES), which sequences 1-2% of the entire human genome containing protein-coding DNA, and clinical exome sequencing (CES), which sequences protein-coding regions of disease-causing genes (approximately 5,000 genes). GS is an all-inclusive technique that detects variants in coding and non-coding regions and copy number variations (CNVs). However, TRE detection is not feasible with these tests [4].

Assessing the diagnostic yield (DY) is a valuable approach to evaluating the performance of NGS tests, providing information on the proportion of patients who receive a positive diagnosis among those who undergo the test. Knowledge of the DY helps clinicians select the most appropriate test, establish realistic patient expectations, and guide research efforts to enhance diagnostic accuracy [5].

Several studies have investigated the DY of NGS-based tests for HA, yielding conflicting and inconclusive results. Herein, we conducted a systematic review to comprehensively summarize the current understanding of the DY of NGS tests for HA. We aim to provide a comprehensive overview of cutting-edge knowledge and facilitate optimal clinical practice and genetic counseling decision-making.

Methods

This systematic review was designed and conducted following the Cochrane recommendations and a modified PICO framework (population, intervention, comparison, and outcomes). It has been prospectively registered in the PROSPERO database under the protocol number CRD42020123868.

Study types

All primary study types were included, including cohort, case-control, cross-sectional, and case studies. Case series of less than ten unrelated ataxic patients submitted to TP and/or ES and/or GS (TP/ES/GS), conference abstracts, and short communications were excluded. Studies that examined multiple neurological disorders instead of solely HA were also excluded. Only publications in English were considered.

PICO framework

Population: studies that included patients with ataxia as a major feature undergoing TP/ES/GS for investigation of HA were eligible. The clinical perspective was assessed whether ataxia was a major feature or an additional finding in a complex phenotype. All age groups were included. Publications that selected a specific group of ataxic individuals (i.e., all patients with ataxia-oculomotor apraxia [AOA]) were included, with specificity reported individually.

Intervention: Studies employing TP/ES/GS for identifying germline variants were eligible. This study categorized the NGS test based on the approach used. TP referred to a targeted approach, while ES indicated a non-targeted approach. If an NGS test sequenced the entire exome but only analyzed a selected number of genes, it was counted as TP because the approach targeted specific genes. Similarly, if an NGS test labeled as TP analyzed all disease-causing genes (approximately 5,000 genes), it was counted as CES (ES) [6]. The aim was to differentiate studies that targeted a specific set of genes from those that did not. WES, mini-exome, CES, exome-CGH, and exomes that analyzed nuclear and/or mitochondrial DNA were included and categorized as ES. Studies that intended to validate TP/ES/GS for repeat expansion detection were not included.

Comparator: When applicable, comparator groups consisted of patients undergoing an alternative diagnostic test. Studies without a comparator group were also eligible (e.g., studies where all participants received only TP/ES/GS).

Outcome: Studies were included if they reported the DY of TP/ES/GS for the population studied. The DY needs to be clearly described, or the necessary information for calculating the DY (such as the number of patients who underwent the test and the number of patients receiving a positive diagnosis) should be evident. DY was defined as the proportion of individuals with a confirmed molecular diagnosis divided by the total number of patients who underwent TP/ES/GS in the cohort [7]. When probands were described separately, the DY was calculated only for probands.

A molecular diagnosis was confirmed when a disease-causing molecular germline variant was detected in a gene associated with the phenotype investigated. Variants classified as pathogenic (P) or likely pathogenic (LP) according to the American College of Genetics and Genomics (ACMG) criteria were considered disease-causing [8]. For autosomal dominant (AD) conditions, at least one P/LP variant was required, while for autosomal recessive (AR) conditions, two P/LP variants were necessary. If the study did not specify otherwise, it was assumed that these two variants were in trans. The classification process was assessed individually if genetic variants were not classified according to the ACMG guideline. When exome sequencing included mtDNA analysis and led to a diagnosis, it was considered a confirmed molecular diagnosis, and this information was reported.

A patient receiving multiple diagnoses related to the primary indication for testing was considered a single positive result. Incidental findings and variants of uncertain significance (VUS) were reported but not considered molecular diagnoses. Studies conducting NGS tests and reporting results for a single gene were excluded. However, studies that utilized NGS to sequence single genes guided by the clinical phenotype and employed TP/ES/GS were included, and all results were considered positive. For example, a study that initially sequenced genes associated with ataxia-oculomotor apraxia and subsequently performed TP/ES/GS was included. Patients who received a diagnosis through the analysis of AOA were counted as positive results of the NGS technique and included in the calculation of DY since they would eventually be diagnosed using other NGS techniques. Exploratory studies and candidate gene studies were excluded. Studies reporting results for the same cohort were merged, and the most recently published study was considered. Supplementary materials were also analyzed for data extraction.

Search methods

In the search process, two electronic databases, Pubmed and Embase, were accessed, along with a review of the reference lists of relevant articles [9-11]. Keywords and Medical Subject Headings (MeSH) were identified in a structured vocabulary (<https://decs.bvsalud.org/>). The terms used were "ataxia" AND "diagnosis" OR "clinical utility" AND "gene sequencing ."The filters used were those previously determined as inclusion or exclusion criteria: language (English) and publication type (case reports and observational studies). Inclusion and exclusion

criteria were applied to filter the articles, considering language (English) and publication type (case reports and observational studies)—the selected publications encompassed January 1, 2016, to October 10, 2022.

No time frame restriction was imposed on manually searched publications. The chosen time frame was based on the release of a guideline for variant classification by the ACMG and the Association for Molecular Pathology in 2015, which aimed to improve the uniformity and reliability of variant classification. Given the direct influence of variant classification on DY, articles published after 2016 were deemed more likely to provide dependable and consistent variant classifications. A detailed line-by-line search strategy is available in Supplementary Material Table 1.

Selection of studies

The selection of studies was imported into Rayyan (<https://www.rayyan.ai/>) and eliminated duplicates. Two independent reviewers (R.T. and K.D.) conducted the initial screening based on titles and abstracts. Irrelevant publications were excluded, and RT and KD thoroughly reviewed the remaining articles, following pre-established inclusion criteria. Two crucial questions were posed during the review: (1) How many individuals with ataxia underwent TP/ES/GS? (2) How many positive results were detected by the NGS tests? Any negative response to these questions led to the exclusion of the article. Additionally, the eligibility of each article was assessed based on the population, intervention, comparator, outcome, and study design criteria. Reasons for exclusion were documented, and any discrepancies were resolved through discussion.

Data extraction

Two reviewers (R.T and K.D) developed a structured extraction form in which relevant data was included. The form captured various aspects of the study, including authors, year, country, sample size, study design, and clinical setting. Participant characteristics, such as sex, parental consanguinity, family history, ancestry, and presumed inheritance pattern, were recorded. Details regarding the diagnostic workup were documented, including the exclusion of acquired causes of ataxia and/or repeat expansions. Information about the ataxia was gathered, such as age at onset, progression, and associated symptoms. Furthermore, data on the NGS test, including the sequencing platform, specific test performed, number of genes analyzed by the panel, and the analysis of mtDNA and/or copy number variations (CNVs), were extracted. The outcome data, encompassing the method for variant

classification and the DY, were recorded, along with the characteristics of positive results, such as family history, parental consanguinity, age at onset, inheritance pattern, and additional features.

Assessment of quality of studies

The quality assessment of primary studies was conducted using the ROBINS-I (Risk Of Bias In Non-randomized Studies - of Interventions) appraisal tool. This tool evaluates the risk of bias in intervention effectiveness or safety estimates for studies that did not employ randomization in allocating interventions. The appraisal tool consists of six domains: confounding and selection of participants, classification of interventions, deviations from intended interventions, missing data, and measurement of outcomes. Each domain contains signaling questions to aid in assessing the risk of bias, and guidance is provided on how to rate the risk of bias for each domain (options include low, moderate, severe, critical, and no information). The summarized results of this appraisal for all domains are presented in Supplementary Material Figure 1 [12]. Studies were not excluded based on quality.

Data synthesis

Given the heterogeneity among the included studies concerning cohort characteristics, disease presentation, inheritance pattern, and diagnostic workup protocols, a narrative synthesis approach was employed for data synthesis. General characteristics of the publications and the primary outcome (DY) were described. Subsequently, the studies were grouped based on specific population characteristics to enable comparisons of the DY according to those specific criteria. The analysis considered the apparent inheritance pattern, evaluated objectively (when reported) or subjectively (e.g., when the population exhibited high parental consanguinity, AR inheritance was inferred).

Statistical analysis

The results were presented as means, medians, standard deviation, confidence intervals (quantitative variables), and frequencies and percentages (categorical variables). The nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was utilized for comparing two groups in terms of quantitative variables. In comparison, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used for comparisons involving more than two groups. The chi-square or Fisher's exact tests were used to compare categorical variables across groups. Spearman's correlation coefficient was estimated to assess associations between variables, with correlation strength classified as very strong

(>0.9), strong (0.7 to 0.89), moderate (0.4 to 0.69), weak (0.2 to 0.39), or very weak (0.0 to 0.19). The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22 software and Excel Office 2010.

Results

Figure 1 illustrates the PRISMA flow diagram employed in this study. A total of 2297 papers were identified through a comprehensive search of electronic databases, while an additional 11 publications were found through manual search. After assessing titles and abstracts, 1861 unique publications remained for evaluation. After excluding 1799 publications based on predefined criteria, 63 articles were read in full, including 34 studies for data extraction. It is important to note that two publications [13, 14] reported the same cohort, which was consolidated as one study for data extraction. Consequently, a total of 33 studies had data extracted, and are summarized in Table 1.

Among the included studies, most (18 out of 33) exhibited a low risk of bias, while 11% (4 out of 33) presented a significant risk of bias in certain aspects. The most common source of bias was associated with measuring outcomes, whereas the lowest risk of bias was observed with confounding factors. Supplementary Material Figure 1 provides further details on the risk of bias assessment.

The included studies collectively involved 3144 participants who underwent NGS tests, all conducted in tertiary centers. The median sample size was 95 participants, ranging from 10 to 412. Geographically, the studies were conducted in 18 countries from all continents, mainly from Europe (Figure 2). The publications were released between 2013 and 2022, with a higher concentration after 2019.

Regarding pathogenicity assessment, 21 studies utilized the ACMG criteria, while the remaining studies either employed in-house systems or did not specify the criteria. When the ACMG criteria were utilized, the median DY was 47.5% with an interquartile range (IQR) of 26.5-60%. VUS yield was reported in 15 publications, with a median yield of 20.6% (IQR: 8-33.6%). The most commonly utilized sequencing platform was Illumina, employed in 18 studies. Incidental findings were not reported.

The median DY across all studies was 43% (IQR: 9.5 - 100%). The lowest DY was observed in a large cohort that was unselected based on age but exhibited a positive family history compatible with autosomal dominant (AD) inheritance, with a DY of 9.5% [15] (Figure 3). Conversely, the highest DY of 100% was observed in a

small cohort with childhood-onset ataxia and a positive family history compatible with AR inheritance [22]. To gain a better understanding of the primary studies, the authors described them and their respective DY based on various characteristics, including cohort selection criteria, previous workup, age group at the onset of ataxia, family history or parental consanguinity, presumed inheritance pattern, and NGS workup. Table 2 provides a summary of this information.

Among the primary studies, approximately one-third (n=11) featured unselected heterogeneous cohorts based on age, family history, or parental consanguinity [9, 25, 27-35]. The remaining two-thirds included selected cohorts (Table 2), and four cohorts were specific to certain phenotypes (episodic ataxia, AOA, congenital ataxia) [14, 17, 20, 36]. The median DY was 68.35% for the phenotype-specific cohorts, 40.45% for the selected cohorts, and 30.5% for the unselected cohorts.

Except for two studies [11, 14], all publications reported some form of previous workup before conducting NGS tests, with the majority excluding TRE beforehand. However, five studies did not report screening for TRE before NGS testing [11, 14, 17, 20, 21]. Among these studies, the median DY was 74.2% (IQR: 33.2-82.5%). Two studies [16, 17] performed cytogenetic tests, such as CGH-Array and karyotype, on a portion of the cohort before employing ES, resulting in DYs of 40% and 80%, respectively. Among the studies that screened for TRE and other common causes before NGS testing (n=22), the median DY was 37.7% (IQR: 9.5-100%). A statistically significant difference was observed between the median DY of studies that performed TRE screening and those that did not ($p=0.047$). Additionally, a weak inverse correlation was found between the DY and the extent of previous genetic investigation ($\rho = -0.323$; $p=0.065$).

Most primary studies (n=20) included patients with ataxia onset in all age groups. Eight out of 33 studies specifically focused on early-onset ataxia (EOA) [5, 16-22], including one study that involved congenital non-progressive ataxia [17]. Five primary studies concentrated on adult/late-onset ataxia [14, 23-26]. The median DY for EOA was 46.6%, while for adult/late-onset ataxia, it was 54.5%. However, the difference in DY between these two groups was not statistically significant.

The cohorts exhibited significant heterogeneity in terms of family history and parental consanguinity. In cohorts where most participants had a positive family history (n=7), the median DY was 40.9% [15, 19, 22, 32, 37-39]. Conversely, in

simplex (sporadic) cases (n=17), the median DY was 33.2% [5, 6, 9, 11, 14-18, 23, 25-19, 32, 40]. In 9 cohorts, there was a high prevalence of parental consanguinity [5, 15, 17, 19, 21, 22, 32, 40, 41]. In these cohorts, the median DY was 52.4% (IQR: 25-100%), and a significant difference was observed when comparing the median DY of studies that considered parental consanguinity versus those that did not ($p=0.009$) (Table 2). Of note, the study of Valence et al. [17] showed a consanguinity rate of 95% and a DY of 80% (16/20).

A total of 7 cohorts consisted of highly consanguineous populations, specific phenotypes (e.g., AOA), or pedigrees with horizontal transmission, indicative of AR inheritance pattern [17, 19-22, 38, 40]. The median DY for these cohorts was 62.5%, with most diagnoses related to AR cerebellar ataxia (ARCA) genes. In 4 publications, all diagnoses were ARCA-related, and homozygosity was frequently observed [6, 18, 19, 32]. One study [17] reported 25% of probands with de novo variants in AD cerebellar ataxia (SCA) genes, with 95% of the cohort born to consanguineous parents and all exhibiting congenital ataxia.

Three cohorts were presumed to have AD inheritance pattern, either due to vertical transmission (1 study) [15] or episodic ataxia (2 studies) [14, 36], with a median DY of 46%. In 23 publications, AR and AD inheritance patterns were considered, resulting in a median DY of 37.7%. The presumed inheritance pattern did not correlate significantly with the DY ($\rho=0.0304$; $p=0.866$). Accounting for the heterogeneous nature of the studies, the presumption of inheritance pattern based on family pedigree before molecular evaluation had a sensitivity of only 60.1% and specificity of 49.5%. Details for each study can be found in Table 3.

Regarding the DY for the NGS techniques employed, publications mainly utilizing ES (n=12) have had a median DY of 41.9% [5, 6, 9, 16, 17, 22, 23, 26, 31, 37, 38, 42]. Studies employing a TP approach (n=13) had a median DY of 46% [11, 14, 15, 19, 20, 21, 27, 25, 29, 33, 36, 40, 43]. Eight publications followed a stepwise approach in which TRE was excluded initially, and patients not diagnosed in this step underwent NGS testing [18, 32, 28, 30, 35, 39, 41, 44]. This stepwise approach resulted in a median yield of 40.3%. Two studies utilized WGS as a complementary NGS method for a few participants [24,30]. When considering only patients who performed WGS, Bogdanova-Mihaylova et al. [24] found a DY of 20% (4/20), and Kang et al. [30] showed a DY of 33%.

The majority of diagnoses were related to ARCA genes in 24 publications [5, 6, 9, 15, 17-24, 26-28, 31-33, 35, 37, 38, 40, 42, 44] and to SCA genes in other 8 [11, 14, 16, 25, 29, 30, 43]. In 1 study [41], the percentages were similar, and one paper reported that 80% of diagnoses were related to mtDNA [44]. The most commonly implicated genes for diagnosis were SACS, which was present in 15 studies and 70 probands [5, 6, 15, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 31, 32, 37, 38, 40] and CACNA1A, which was present in 14 papers and 77 probands [9, 11, 14, 15, 17, 22, 25, 29-31, 33, 36, 42, 43]. SYNE1 was reported in 12 studies [6, 9, 11, 15, 18, 22, 23, 26, 28, 31-33] and 38 probands; SETX and SPG7 were respectively diagnostic in 68 and 65 probands and 11 studies each [5, 15, 18, 20, 22, 27, 31, 32, 35, 38, 41] [9, 11, 15, 23, 24, 26, 29, 31, 33, 37, 38, 43]. The other genes that were diagnostic in more than one paper were *ITPR1*, *APTX*, *SPG11*, *ANO10*, *ATM*, *ADCK3*, *ATP1A3*, *CACNA1G*, *COQ8A*, *NPC1*, *PNKP*, *PRKCG*, *SPTBN2*, *TTPA*, *AFG3L2*, *KCNC3*, *MRE11*, *PNPLA6*, *POLG*, *PRNP*, *SCN2A* and *SLC1A3*. Additionally, 47 other genes were identified as causing HA in a single study. The genes are listed in Supplementary Material Table 2.

DISCUSSION

In our study, we comprehensively examined the current knowledge on the DY of NGS techniques for HA. This study is the most extensive systematic review conducted on this topic. We extracted relevant data from 33 primary studies following a meticulous and systematic search process. Our analysis revealed a wide range of DY values, from 9.5% to 100%. The median DY achieved in these studies was 47.5%. This considerable variability can be attributed to the inherent heterogeneity among the included studies. When devising our selection criteria, we aimed to accurately reflect the heterogeneity observed in clinical practice, as ataxic patients often exhibit diverse characteristics. Therefore, we specifically focused on distinct parameters, including cohort selection criteria, prior diagnostic investigations, age group at the onset of ataxia, family history or parental consanguinity, presumed inheritance pattern, and the specific NGS methodology employed.

Throughout our review, we observed substantial heterogeneity regarding the methodologies employed and the clinical characteristics of the study cohorts. However, the criteria utilized for variant classification demonstrated relative uniformity. Of the included studies, 21 reported implementing the criteria outlined by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [6, 9, 11, 14,

16-19, 21-23, 25, 28, 30-33, 35, 38, 42, 44]. Eight studies did not explicitly mention the criteria they employed for variant classification [5, 20, 24, 26, 29, 40, 41, 43], while four studies utilized methods and rationale similar to those of the ACMG [15, 27, 36, 37].

Two significant initial observations can be derived from the patient populations examined in this review. Firstly, despite the low prevalence of HA, a majority of the studies (n=18) included sample sizes with over 50 probands [9, 11, 15, 18-20, 23, 24, 26, 28, 29, 31-33, 38, 40, 42, 43], and seven studies even had cohorts with more than 100 probands [11, 15, 23, 29, 33, 38, 43]. It is worth noting that there was a lack of diversity in patient ancestry across cohorts, with several studies predominantly comprising patients of Caucasian/European descent. Alongside these relatively large sample sizes, many cohorts specifically focused on distinct HA phenotypes, and their DY indicated that NGS may offer more excellent utility for specific HA subgroups. For instance, Da Costa SCG et al. [20] selected probands with AOA, achieving a diagnostic yield of 62.5%. Maksemous et al. [14] and Choi et al. [36] cohorts included episodic ataxia with 74.2% and 46% DY, respectively. Eleven studies exhibited a lower selection bias as they included unselected samples (not selected based on age at onset, family history, or other features) [9, 25, 27-33, 35, 42]. However, only one study (Sun et al.) [33] reported a consecutive sample. The median DY for these studies was 35.5%, while the median yield for the 18 studies that selected their samples was 40.45% [5, 6, 11, 15, 16, 18, 19, 21-24, 26, 37, 38, 40, 41, 43, 44].

Secondly, in most cohorts, other types of HA were excluded before performing NGS tests. Out of the 33 studies, 28 reported excluding TRE before conducting NGS tests, with 22 excluding FRDA and the main SCAs [5, 6, 9, 15, 16, 18, 22-24, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 35, 37, 38, 41-44], and six excluding either FRDA or SCAs [19, 25, 28, 32, 36, 40]. Five studies did not report excluding TRE before NGS testing [11, 14, 17, 20, 21]. Surprisingly, these five studies achieved a median yield of 74.2%. The difference with the other studies was statistically significant ($p=0.047$), and a weak inverse correlation was observed between the DY and the extent of previous genetic investigation ($\rho = -0.323$; $p=0.065$). This discrepancy is intriguing as TRE are not detectable by NGS tests and are a common cause of HA. The reason for this inconsistency is likely selection bias. Except for Galatolo et al. [11], Mutlu-Albayrak et al. [21], Valence et al. [17], Maksemous et al. [14], and Costa et al. [20] cohorts were selected either based on age at onset (very early-onset ataxia) or by phenotype

(AOA, episodic ataxia). The DY is likely higher in these specific groups because they are more likely to have a monogenic cause, and TRE is not a prevalent cause of ataxia in these cases. Of note, the technological advances in molecular tests will likely resolve the issue of TRE-specific testing. Long-read sequencing is a new technique that will likely replace NGS sequencing shortly and detects structural variants, cryptic splicing variants, mobile insertion elements, and repeat expansions [45].

Among the highest DY, three studies stand out with rates of 82.5%, 94.4%, and 100% [21, 22, 41]. They all shared high rates of positive family history and/or parental consanguinity. Santos et al. [22] achieved a 100% DY by performing ES on 19 families. Their cohort was selected based on presumed AR inheritance pattern (affected sibling or parental consanguinity), and most patients had childhood-onset ataxia. This cohort identified three cases of AD inheritance pattern ataxia caused by de novo variants in CACNA1A, KIF1A, and ATP1A3 genes. These families had been identified during a national population survey in Portugal. However, despite extensive investigations involving TRE, AOA1, AOA2, FRDA, α -TTP, HSP11, and HSP genes, they remained without a molecular diagnosis for many years. On the other hand, the lowest diagnostic yield of 9.5% was unexpectedly low in the study by Coutelier et al. [43], considering that 95% of the probands had an affected parent. They employed a targeted panel of 69 genes, including ARCA genes.

The heterogeneity among the selected studies is also evident when examining the sensitivity and specificity for presumed inheritance patterns before genetic testing and confirmed inheritance patterns after the analyses. Calculations considering studies with available data show very low sensitivity and specificity for predicting inheritance patterns through clinical history (Table 3). Therefore, particularly in cases where the researcher is dealing with a highly heterogeneous sample or the clinician struggles to evaluate whether the inheritance pattern is truly AR, we find it inappropriate to consider this as the sole parameter for choosing the type of testing for the patient under study. Furthermore, even among individuals in a population with the highest probability of having a Mendelian genetic condition that can be identified through NGS, approximately half of the patients remain undiagnosed. There are two main reasons for this: new ataxia genes are yet to be discovered, or variants are located in intronic regions.

Our review does not provide evidence supporting a higher DY for ES compared to TP. The median DY for ES and TP were 41.9% and 46%, respectively. However, it is worth noting that in some papers, ES likely increased the DY by detecting variants in genes that would not have been sequenced using TP. For example, Valence et al. [17] conducted singleton-ES in 20 patients with congenital ataxia, resulting in a DY of 80%. Seven of the diagnosed cases had pathogenic variants in known HA genes that would have been included in a TP. Another seven patients had pathogenic variants in genes previously implicated in other neurological phenotypes, and two patients had pathogenic variants in new candidate genes.

Despite parental consanguinity, four patients carried heterozygous de novo pathogenic variants (i.e., AD ataxia), which might have been overlooked in an ARCA panel. It is also noteworthy that the supplementary material contains a list of genes related to diagnosis, including 38 genes that were diagnostic for two or more probands (likely representing the most common HA genes) and 36 genes that were diagnostic in a single proband (likely representing some ultra-rare HA genes). It remains to be seen whether these ultra-rare genes would be included in all targeted panels for HA. Therefore, despite the lack of statistically significant differences in DY between these two NGS tests, it is reasonable to suggest that ES is a better method, especially considering the rapid decline in costs associated with ES. S. It is important to highlight that additional research is needed to assess the value of VUS and incidental findings to gain a more comprehensive understanding of ES's associated risks and drawbacks.

CONCLUSION

In conclusion, this systematic review allows some considerations. First, it seems that NGS tests have better diagnostic yields for cases with presumed AR inheritance pattern, positive family history, and parental consanguinity. Second, despite the lack of statistical significance between the median DY when TP ou ES were used, it is likely that ES has advantages for detecting ultra-rare and newly discovered genes related to HA. The decreasing costs of these techniques will make ES more available. Third, the median diagnostic yield of the primary studies was 47.5%, which confirms the NGS as a powerful ally in the diagnostic process but also points to important limitations. Despite cohort selection, TRE previous exclusion, positive family histories and broad NGS tests, more than 50% of cases remained unsolved. The availability of long-read sequencing tests in the near future and the

detection of the TRE, common cause of HA, will provide a straightforward diagnostic tool for HA, but it will not transpone the boundary of the genes responsible for HA yet to be discovered. Last, the primary studies exhibit significant clinical and methodological heterogeneity, reducing our findings' precision and further studies, especially meta-analyses, will improve our current knowledge on this topic.

ACKNOWLEDGMENTS

Declared None.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

Not applicable.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

This research received no specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

DISCLOSURE

Renata Barreto Tenório received an MSc scholarship from the Brazilian government through CAPES-CNPq.

The authors report no disclosures relevant to this manuscript.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The authors contributed equally to the manuscript. Renata Barreto Tenorio and Helio A. G. Teive performed the project conception. Renata Barreto Tenorio and Claudia Choma Bettega Almeida performed the project organization. Renata Barreto Tenorio and Karina Carvalho Donis performed project execution and data acquisition. Renata Barreto Tenorio, Karina Carvalho Donis, and Carlos Henrique Ferreira Camargo performed data analysis and interpretation—statistics performed by Renata Barreto Tenorio and Carlos Henrique Ferreira Camargo. Renata Barreto Tenorio

performed manuscript writing. Carlos Henrique Ferreira Camargo and Helio A. G. Teive performed a manuscript review and critique.

Authors' roles

Project: A. Conception, B. Organization, C. Execution;

Data: A. Acquisition, B. Analysis and interpretation, C. Statistics

Manuscript: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique.

Renata Barreto Tenorio, MD – 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A

Carlos Henrique Ferreira Camargo, MD, PhD, FAAN – 2B, 2C, 3B

Karina Carvalho Donis, MD, PhD – 1C, 2A, 2B

Claudia Choma Bettega Almeida, NT, PhD – 1B, 3B

Hélio A.G. Teive, MD, PhD – 1A, 1B, 3B

REFERENCES

1- Parodi L, Coarelli G, Stevanin G, Brice A, Durr A. Hereditary ataxias and paraparesias: clinical and genetic update. *Curr Opin Neurol*. 2018 Aug;31(4):462-471. doi: 10.1097/WCO.0000000000000585. PMID: 29847346.

2- Novis LE, Spitz M, Jardim M, Raskin S, Teive HAG. Evidence and practices of the use of next generation sequencing in patients with undiagnosed autosomal dominant cerebellar ataxias: a review. *Arq Neuro-Psiquiatr* [Internet]. 2020Sep;78(9):576–85. Available from: <https://doi.org/10.1590/0004-282X20200017>.

3- Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol*. 2010 Sep;9(9):885-94. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70183-6. PMID: 20723845.

4- Coarelli G, Wirth T, Tranchant C, Koenig M, Durr A, Anheim M. The inherited cerebellar ataxias: an update. *J Neurol*. 2023 Jan;270(1):208-222. doi: 10.1007/s00415-022-11383-6. Epub 2022 September 24. PMID: 36152050; PMCID: PMC9510384.

5- Sawyer SL, Schwartzentruber J, Beaulieu CL, Dymment D, Smith A, Warman Chardon J, Yoon G, Rouleau GA, Suchowersky O, Siu V, Murphy L, Hegele RA, Marshall CR; FORGE Canada Consortium; Bulman DE, Majewski J, Tarnopolsky M, Boycott KM. Exome sequencing as a diagnostic tool for pediatric-onset ataxia. *Hum Mutat*. 2014 Jan;35(1):45-9. doi: 10.1002/humu.22451. PMID: 24108619; PMCID: PMC4255313.

6- Krygier M, Kwarcianny M, Wasilewska K, Pienkowski VM, Krawczyńska N, Zielonka D, Kosińska J, Stawinski P, Rudzińska-Bar M, Boczarska-Jedynak M, Karaszewski B, Limon J, Sławek J, Płoski R, Rydzanicz M. A study in a Polish ataxia cohort indicates genetic heterogeneity and points to MTCL1 as a novel candidate gene. *Clin Genet*. 2019 Mar;95(3):415-419. doi: 10.1111/cge.13489. Epub 2019 January 8. PMID: 30548255.

7- Weiss MM, Van der Zwaag B, Jongbloed JD, Vogel MJ, Brüggewirth HT, Lekanne Deprez RH, Mook O, Ruivenkamp CA, van Slegtenhorst MA, van den Wijngaard A, Waisfisz Q, Nelen MR, van der Stoep N. Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: a national collaborative study of Dutch genome diagnostic laboratories. *Hum Mutat*. 2013 Oct;34(10):1313-21. doi: 10.1002/humu.22368. Epub 2013 August 19. PMID: 23776008.

8- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.

9- Kim M, Kim AR, Kim JS, et al. Clarification of undiagnosed ataxia using whole-exome sequencing with clinical implications. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2020 Nov;80:58-64. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.08.040. PMID: 32961395.

10- Montaut S, Tranchant C, Drouot N, et al. Assessment of a Targeted Gene Panel for Identification of Genes Associated With Movement Disorders. *JAMA Neurol*. 2018;75(10):1234–1245. doi:10.1001/jamaneurol.2018.1478.

11- Galatolo D, Tessa A, Filla A, Santorelli FM. Clinical application of next generation sequencing in hereditary spinocerebellar ataxia: increasing the diagnostic yield and broadening the ataxia-spasticity spectrum. A retrospective analysis. *Neurogenetics*. 2018 Jan;19(1):1-8. doi: 10.1007/s10048-017-0532-6. Epub 2017 December 6. PMID: 29209898.

12- Sterne J A, Hernn M A, Reeves BC, Savovi J, Berkman N D, Viswanathan M, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomized studies of interventions BMJ 2016; 355:i4919 doi:10.1136/bmj.i4919

13- Maksemous N, Roy B, Smith RA, Griffiths LR. Next-generation sequencing identifies novel CACNA1A gene mutations in episodic ataxia type 2. Mol Genet Genomic Med. 2016 January 20;4(2):211-22. doi: 10.1002/mgg3.196. PMID: 27066515; PMCID: PMC4799871.

14 - Maksemous N, Sutherland HG, Smith RA, Haupt LM, Griffiths LR. Comprehensive Exonic Sequencing of Known Ataxia Genes in Episodic Ataxia. Biomedicines. 2020 May 25;8(5):134. doi: 10.3390/biomedicines8050134. PMID: 32466254; PMCID: PMC7277596.

15- Coutelier M, Hammer MB, Stevanin G, Monin ML, Davoine CS, Mochel F, Labauge P, Ewencyk C, Ding J, Gibbs JR, Hannequin D, Melki J, Toutain A, Laugel V, Forlani S, Charles P, Broussolle E, Thobois S, Afenjar A, Anheim M, Calvas P, Castelnovo G, de Broucker T, Vidailhet M, Moulignier A, Ghnassia RT, Tallaksen C, Mignot C, Goizet C, Le Ber I, Ollagnon-Roman E, Pouget J, Brice A, Singleton A, Durr A; Spastic Paraplegia and Ataxia Network. Efficacy of Exome-Targeted Capture Sequencing to Detect Mutations in Known Cerebellar Ataxia Genes. JAMA Neurol. 2018 May 1;75(5):591-599. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.5121. PMID: 29482223; PMCID: PMC5885259.

16- Ignatius E, Isohanni P, Pohjanpelto M, Lahermo P, Ojanen S, Brilhante V, Palin E, Suomalainen A, Lnnqvist T, Carroll CJ. Genetic background of ataxia in children younger than 5 years in Finland. Neurol Genet. 2020 Jun 5;6(4):e444. doi: 10.1212/NXG.0000000000000444. PMID: 32637629; PMCID: PMC7323479.

17-Valence S, Cochet E, Rougeot C, Garel C, Chantot-Bastaraud S, Lainey E, Afenjar A, Barthez MA, Bednarek N, Doummar D, Faivre L, Goizet C, Haye D, Heron B, Kemlin I, Lacombe D, Milh M, Moutard ML, Riant F, Robin S, Roubertie A, Sarda P, Toutain A, Villard L, Ville D, Billette de Villemeur T, Rodriguez D, Burglen L. Exome sequencing in congenital ataxia identifies two new candidate genes and highlights a pathophysiological link between some congenital ataxias and early infantile epileptic encephalopathies. Genet Med. 2019 Mar;21(3):553-563. doi: 10.1038/s41436-018-0089-2. Epub 2018 July 12. PMID: 29997391.

18- Shakya S, Kumari R, Suroliya V, Tyagi N, Joshi A, Garg A, Singh I, Kalikavil Puthanveedu D, Cherian A, Mukerji M, Srivastava AK, Faruq M. Whole

exome and targeted gene sequencing to detect pathogenic recessive variants in early onset cerebellar ataxia. *Clin Genet.* 2019 Dec;96(6):566-574. doi: 10.1111/cge.13625. Epub 2019 September 1. PMID: 31429931.

19- Arslan EA, Öncel İ, Ceylan AC, Topçu M, Topaloğlu H. Genetic and phenotypic features of patients with childhood ataxias diagnosed by next-generation sequencing gene panel. *Brain Dev.* 2020 Jan;42(1):6-18. doi: 10.1016/j.braindev.2019.08.004. Epub 2019 September 4. PMID: 31493945.

20- da Costa SCG, Rezende Filho FM, de Freitas JL, de Assis Pereira Matos PCA, Della-Ripa B, França MC Jr, Marques W Junior, Santos M, Cronemberger IVB, Vale TC, Kok F, Alonso I, Pedroso JL, Barsottini OGP. Clinical and Genetic Characterization of Brazilian Patients with Ataxia and Oculomotor Apraxia. *Mov Disord.* 2022 Jun;37(6):1309-1316. doi: 10.1002/mds.29015. Epub 2022 April 14. PMID: 35426160.

21- Mutlu-Albayrak H, Kırat E, Gürbüz G. Childhood-onset autosomal recessive ataxias: a cross-sectional study from Turkey. *Neurogenetics.* 2020 Jan;21(1):59-66. doi: 10.1007/s10048-019-00597-y. Epub 2019 November 19. PMID: 31741144.

22- Santos M, Damásio J, Carmona S, Neto JL, Dehghani N, Guedes LC, Barbot C, Barros J, Brás J, Sequeiros J, Guerreiro R. Molecular Characterization of Portuguese Patients with Hereditary Cerebellar Ataxia. *Cells.* 2022 Mar 12;11(6):981. doi: 10.3390/cells11060981. PMID: 35326432; PMCID: PMC8946949.

23- Ngo KJ, Rexach JE, Lee H, Petty LE, Perlman S, Valera JM, Deignan JL, Mao Y, Aker M, Posey JE, Jhangiani SN, Coban-Akdemir ZH, Boerwinkle E, Muzny D, Nelson AB, Hassin-Baer S, Poke G, Neas K, Geschwind MD, Grody WW, Gibbs R, Geschwind DH, Lupski JR, Below JE, Nelson SF, Fogel BL. A diagnostic ceiling for exome sequencing in cerebellar ataxia and related neurological disorders. *Hum Mutat.* 2020 Feb;41(2):487-501. doi: 10.1002/humu.23946. Epub 2019 November 25. PMID: 31692161; PMCID: PMC7182470.

24- Bogdanova-Mihaylova P, Hebert J, Moran S, Murphy M, Ward D, Walsh RA, Murphy SM. Inherited Cerebellar Ataxias: 5-Year Experience of the Irish National Ataxia Clinic. *Cerebellum.* 2021 Feb;20(1):54-61. doi: 10.1007/s12311-020-01180-0. PMID: 32816195.

25- Radziwonik W, Elert-Dobkowska E, Klimkowicz-Mrowiec A, Ziora-Jakutowicz K, Stepniak I, Zaremba J, Sulek A. Application of a custom NGS

gene panel revealed a high diagnostic utility for molecular testing of hereditary ataxias. *J Appl Genet.* 2022 Sep;63(3):513-525. doi: 10.1007/s13353-022-00701-3. Epub 2022 May 19. PMID: 35588347.

26- Fogel BL, Lee H, Deignan JL, Strom SP, Kantarci S, Wang X, Quintero-Rivera F, Vilain E, Grody WW, Perlman S, Geschwind DH, Nelson SF. Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA Neurol.* 2014 Oct;71(10):1237-46. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1944. Erratum in: *JAMA Neurol.* 2015 Jan;72(1):128. PMID: 25133958; PMCID: PMC4324730.

27- Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, Parolin Schnekenberg R, Becker EB, Bera KD, Shanks ME, Gregory L, Buck D, Zameel Cader M, Talbot K, de Silva R, Fletcher N, Hastings R, Jayawant S, Morrison PJ, Worth P, Taylor M, Tolmie J, O'Regan M; UK Ataxia Consortium; Valentine R, Packham E, Evans J, Seller A, Ragoussis J. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain.* 2013 Oct;136(Pt 10):3106-18. doi: 10.1093/brain/awt236. Epub 2013 September 11. PMID: 24030952; PMCID: PMC3784284.

28- Wan N, Chen Z, Wan L, Yuan H, Tang Z, Liu M, Peng Y, Peng L, Lei L, Xie Y, Deng Q, Wang S, Wang C, Peng H, Hou X, Shi Y, Long Z, Qiu R, Xia K, Tang B, Jiang H. Genetic etiology of a Chinese ataxia cohort: Expanding the mutational spectrum of hereditary ataxias. *Parkinsonism Relat Disord.* 2021 Aug;89:120-127. doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.07.010. Epub 2021 July 10. PMID: 34284285.

29- Hadjivassiliou M, Martindale J, Shanmugarajah P, et al. Causes of progressive cerebellar ataxia: prospective evaluation of 1500 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017;88:301-309.

30- Kang C, Liang C, Ahmad KE, et al. High Degree of Genetic Heterogeneity for Hereditary Cerebellar Ataxias in Australia. *Cerebellum.* 2019;18:137-146. doi: 10.1007/s12311-018-0969-7.

31-da Graça FF, Peluzzo TM, Bonadia LC, Martinez ARM, Diniz de Lima F, Pedroso JL, Barsottini OGP, Gama MTD, Akçimen F, Dion PA, Rouleau GA, Marques W Jr, França MC Jr. Diagnostic Yield of Whole Exome Sequencing for Adults with Ataxia: a Brazilian Perspective. *Cerebellum.* 2022 Feb;21(1):49-54. doi: 10.1007/s12311-021-01268-1. PMID: 33956305.

32- Cheng HL, Shao YR, Dong Y, Dong HL, Yang L, Ma Y, Shen Y, Wu ZY. Genetic spectrum and clinical features in a cohort of Chinese patients with autosomal recessive cerebellar ataxias. *Transl Neurodegener.* 2021 Oct 18;10(1):40. doi: 10.1186/s40035-021-00264-z. PMID: 34663476; PMCID: PMC8522248.

33- Sun M, Johnson AK, Nelakuditi V, Guidugli L, Fischer D, Arndt K, Ma L, Sandford E, Shakkottai V, Boycott K, Warman-Chardon J, Li Z, Del Gaudio D, Burmeister M, Gomez CM, Waggoner DJ, Das S. Targeted exome analysis identifies the genetic basis of disease in over 50% of patients with a wide range of ataxia-related phenotypes. *Genet Med.* 2019 Jan;21(1):195-206. doi: 10.1038/s41436-018-0007-7. Epub 2018 June 18. PMID: 29915382; PMCID: PMC6524765.

34- Gauquelin L, Hartley T, Tarnopolsky M, Dymment DA, Brais B, Geraghty MT, Tétreault M, Ahmed S, Rojas S, Choquet K, Majewski J, Bernier F, Innes AM, Rouleau G, Suchowersky O, Boycott KM, Yoon G. Channelopathies Are a Frequent Cause of Genetic Ataxias Associated with Cerebellar Atrophy. *Mov Disord Clin Pract.* 2020 Sep 29;7(8):940-949. doi: 10.1002/mdc3.13086. PMID: 33163565; PMCID: PMC7604675.

35- Perez Maturo J, Zavala L, Vega P, González-Morón D, Medina N, Salinas V, Rosales J, Córdoba M, Arakaki T, Garretto N, Rodríguez-Quiroga S, Kauffman MA. Overwhelming genetic heterogeneity and exhausting molecular diagnostic process in chronic and progressive ataxias: facing it up with an algorithm, a gene, a panel at a time. *J Hum Genet.* 2020 Oct;65(10):895-902. doi: 10.1038/s10038-020-0785-z. Epub 2020 June 3. PMID: 32488064.

36- Choi KD, Kim JS, Kim HJ, Jung I, Jeong SH, Lee SH, Kim DU, Kim SH, Choi SY, Shin JH, Kim DS, Park KP, Kim HS, Choi JH. Genetic Variants Associated with Episodic Ataxia in Korea. *Sci Rep.* 2017 Oct 23;7(1):13855. doi: 10.1038/s41598-017-14254-7. PMID: 29062094; PMCID: PMC5653837.

37- Pyle A, Smertenko T, Bargiela D, Griffin H, Duff J, Appleton M, Douroudis K, Pfeffer G, Santibanez-Koref M, Eglon G, Yu-Wai-Man P, Ramesh V, Horvath R, Chinnery PF. Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias. *Brain.* 2015 Feb;138(Pt 2):276-83. doi: 10.1093/brain/awu348. Epub 2014 December 12. PMID: 25497598; PMCID: PMC4306819.

38- Vural A, Şimşir G, Tekgül Ş, Koçoğlu C, Akçimen F, Kartal E, Şen NE, Lahut S, Ömür Ö, Saner N, Gül T, Bayraktar E, Palvadeau R, Tunca C, Pirkevi

Çetinkaya C, Gündoğdu Eken A, Şahbaz I, Kovancılar Koç M, Öztop Çakmak Ö, Hanağası H, Bilgiç B, Eraksoy M, Gündüz A, Apaydın H, Kızıltan G, Özekmekçi S, Siva A, Altıntaş A, Kaya Güleç ZE, Parman Y, Oflazer P, Deymeer F, Durmuş H, Şahin E, Çakar A, Tüfekçioğlu Z, Tektürk P, Çorbalı MO, Tireli H, Akdal G, Yiş U, Hız S, Şengün İ, Bora E, Serdaroğlu G, Erer Özbek S, Ağan K, İnce Günal D, Us Ö, Kurt SG, Aksoy D, Bora Tokçaer A, Elmas M, Gültekin M, Kumandaş S, Acer H, Kaya Özçora GD, Yayla V, Soysal A, Genç G, Güllüoğlu H, Kotan D, Özözen Ayas Z, Şahin HA, Tan E, Topçu M, Topçuoğlu ES, Akbostancı C, Koç F, Ertan S, Elibol B, Başak AN. The Complex Genetic Landscape of Hereditary Ataxias in Turkey and Implications in Clinical Practice. *Mov Disord*. 2021 Jul;36(7):1676-1688. doi: 10.1002/mds.28518. Epub 2021 Feb 24. PMID: 33624863.

39- Bogdanova-Mihaylova P, Hebert J, Moran S, Murphy M, Ward D, Walsh RA, Murphy SM. Inherited Cerebellar Ataxias: 5-Year Experience of the Irish National Ataxia Clinic. *Cerebellum*. 2021 Feb;20(1):54-61. doi: 10.1007/s12311-020-01180-0. PMID: 32816195.

40- Hamza W, Ali Pacha L, Hamadouche T, Muller J, Drouot N, Ferrat F, Makri S, Chaouch M, Tazir M, Koenig M, Benhassine T. Molecular and clinical study of a cohort of 110 Algerian patients with autosomal recessive ataxia. *BMC Med Genet*. 2015 June 12;16:36. doi: 10.1186/s12881-015-0180-3. PMID: 26068213; PMCID: PMC4630839.

41- Balakrishnan S, Aggarwal S, Muthulakshmi M, Meena AK, Borgohain R, Mridula KR, Yareeda S, Ranganath P, Dalal A. Clinical and Molecular Spectrum of Degenerative Cerebellar Ataxia: A Single Centre Study. *Neurol India*. 2022 May-Jun;70(3):934-942. doi: 10.4103/0028-3886.349660. PMID: 35864621.

42- Gauquelin L, Hartley T, Tarnopolsky M, Dymment DA, Brais B, Geraghty MT, Tétreault M, Ahmed S, Rojas S, Choquet K, Majewski J, Bernier F, Innes AM, Rouleau G, Suchowersky O, Boycott KM, Yoon G. Channelopathies Are a Frequent Cause of Genetic Ataxias Associated with Cerebellar Atrophy. *Mov Disord Clin Pract*. 2020 Sep 29;7(8):940-949. doi: 10.1002/mdc3.13086. PMID: 33163565; PMCID: PMC7604675.

43- Coutelier M, Coarelli G, Monin ML, Konop J, Davoine CS, Tesson C, Valter R, Anheim M, Behin A, Castelnovo G, Charles P, David A, Ewencyk C, Fradin M, Goizet C, Hannequin D, Labauge P, Riant F, Sarda P, Sznajer Y, Tison F, Ullmann U, Van Maldergem L, Mochel F, Brice A, Stevanin G, Durr A; SPATAX network. A panel

study on patients with dominant cerebellar ataxia highlights the frequency of channelopathies. *Brain*. 2017 Jun 1;140(6):1579-1594. doi: 10.1093/brain/awx081. PMID: 28444220.

44- Dong HL, Ma Y, Li QF, Du YC, Yang L, Chen S, Wu ZY. Genetic and clinical features of Chinese patients with mitochondrial ataxia identified by targeted next-generation sequencing. *CNS Neurosci Ther*. 2019 Jan;25(1):21-29. doi: 10.1111/cns.12972. Epub 2018 May 13. PMID: 29756269; PMCID: PMC6436592.

TABLES

Table 1. Summary of included articles

Study/country	Diagnostic yield % (n)	Main features	NGS workup/TP (n genes)	Acquires causes/TRE exclusion	Age at onset	Inheritance prediction	Family history/parental consanguinity/simplex	Most common diagnosis	Inheritance of diagnosis (%) AR/AD
Coutelier M (2017)/France	9.5 (39/142)	Positive FH	TP (69 genes)	-/+	All	AD	+/-/-	<i>CACNA1A</i> (16)	23/76
Dong HL/China	15 (5/33)	Positive FH	TP (46, 56, mtDNA)	+/+	All	AD/AR	+/-/-	<i>mtDNA</i> (4)	0/0 (X-1, 20%; mtDNA, 80%)
Németh AH/UK	18 (9/50)	Unselected	TP (118 genes)	+/+	All	AD/AR		<i>SETX</i> (2)	66.6/33.3
Fogel BL/USA	21 (16/76)	Adult-onset sporadic ataxia	ES (clinical exome)	+/+	LO	AD/AR	-/-/+	<i>SYNE1</i> (3)	87.5/12.5
Shakya S/India	21.4 (21/98)	Early onset, no vertical transmission	TP (41)/ES	-/+	EO	AD/AR		<i>SACS</i> (7)	100/0
Wan N/China	21.67 (13/60)	Unselected	TP (230, 220, 3700)/ES	+/+	All	AD/AR		<i>SPG11</i> (2)	77/15
Ngo KJ/USA	24 (44/184)	Adult-onset sporadic ataxia	ES	+/+	LO	AD/AR	-/-/+	<i>SPG7</i> (9)	63/36
Arslan EA/Turkey	25 (21/84)	Positive FH and CP	TP (111)	+/+	EO	AR	+/-/-	<i>PLA2G6</i> (7)	100/0
Minkyeeoung K/ South Korea	26.5 (18/68)	Unselected	ES	+/+	All	AD/AR		<i>SPG7/SPG11/APTX/SYNE1</i>	77.7/22.3
Coutelier M/ France	28.5 (91/319)	No vertical transmission	TP (209)	-/+	All	AD/AR		<i>SPG7</i> (14)	81/19
Hadjivassiliou M/ UK	32 (46/146)	Unselected	TP (42)	+/+	All	AD/AR		<i>CACNA1A</i> (11)	17.5/82.6
Galatolo D/Italy	33.2 (125/377)	No FH	TP (> 200)	-; -	All	AD/AR	-/-/+	<i>STUB1, PRKCG, SPG7, CACNA1A, PNPLA6, SYNE1, TMEM240, CACNA1G, ITPRI</i>	44/52.7
Kang C/Australia	34.3 (12/35)	Unselected	TP (46, 98)	+/+	All	AD/AR		<i>CACNA1A</i>	33/66
da Graça FF/Brazil	35.5 (27/76)	Unselected	ES	-/+	All	AD/AR		<i>SPG7</i> (4)	67/33
Ignatius E/Finland	40 (20/50)	Onset before age 5 yo	ES	-/+	VEO	AD/AR	-/-/+	<i>EBF3</i> (3)	45/55
Pyle A/UK	40.9 (9/22)	Positive FH	ES	+/+	All	AD/AR	+/-/-	<i>SACS</i> (3)	55.5/44.5
Vural A/Turkey	43 (108/251)	Positive FH	ES	-/+	All	AR	+/-/-	<i>SACS</i> (23)	95/5
Dong-Choi K/ South Korea	46 (18/39)	Episodic ataxia	TP (5)	-/+	All	AD		<i>CACNA1A</i> (7)	0/100
Cheng HL/China	46.3 (25/54)	Unselected	ES	+/+	All	AD/AR		<i>SACS</i> (6)	100/0
Sawyer SL/Canada	46.42 (13/28)	Childhood onset	ES	+/+	EO	AD/AR		<i>SACS</i> (2)	77/23

Study/country	Diagnostic yield % (n)	Main features	NGS workup/TP (n genes)	Acquires causes/TRE exclusion	Age at onset	Inheritance prediction	Family history/parental consanguinity/simplex	Most common diagnosis	Inheritance of diagnosis (%) AR/AD
Bogdanova-Mihaylova P/Ireland	46.6 (35/84)	Positive FH/adult onset	TP (4–102)/ES/GS (mtDNA)	+/+	LO	AD/AR	+/-/-	<i>SPG7(21)</i>	77/17
Sun M/USA	52 (88/170)	Unselected	TP (441)	-/+	All	AD/AR		<i>SPG7(8)</i>	60/38.6
Hamza W/Algeria	52.4 (44/84)	Consanguinity	TP (57)	-/+	All	AR	-/+/-	<i>TTPA(19)</i>	100/0
Gauquelin L/Canada	53 (35/66)	Unselected	ES	+/+	All	AD/AR		<i>CACNA1A(4)</i>	60/40
Radziwonik W/Poland	55.2 (16/29)	Unselected	TP (152)	+/+	LO	AD/AR		<i>POLG(5)</i>	31/69
Krygier M/Poland	60 (6/10)	Sporadic ataxia with onset before 30 y	ES	-/+	All	AD/AR	-/-/+	<i>POLR3B/NPC1/MTCLI/SACS/ADCK3/SYNE1</i>	100/0
da Costa SCG/Brazil	62.5 (32/52)	Ataxia with ocular apraxia	TP (5)	+/-	EO	AR		<i>SETX(15)</i>	100/0
Maturo JP/Argentina	65 (18/26)	Unselected	TP/ES/GS	+/+	All	AD/AR		<i>SCN2A(3)</i>	77.7/22.3
Maksemous N/Australia	74.2 (23/31)	Episodic ataxia	TP (5, 170, 353)	-; -	All	AD		<i>CACNA1A(15)</i>	0/100
Valence S/France	80 (16/20)	Congenital ataxia	ES	+/-	VEO	AR	+/+/-	<i>BRAT1 (3)</i>	75/25
Mutlu-Albayrak H/Turkey	82.5 (33/40)	Positive FH or CP/childhood onset	TP (13)	+/-	EO	AR	+/+/-	<i>ATM(24)</i>	100/0
Balakrishnan S/India	94.4 (17/18)	Positive FH	TP	+/+	All	AD/AR	+/+/-	<i>SETX(4)</i>	47/41
Santos M/Portugal	100 (19/19)	Positive FH/childhood onset	ES	-/+	EO	AR	+/-/-	<i>SACS</i>	84/16

Table 2: Diagnostic Yield according to selected features

Variables	Median (IQR) %	<i>p</i>
Previous workup		
Extensively prescreened (TRE, at least FRDA and main SCAs) (<i>n</i> = 22)	37.7 (9.5–100) %	0.047*
FRDA or main SCAs (<i>n</i> = 6)	42.1 (21.6–55.2) %	
No TRE screened (<i>n</i> = 5)	74.2 (33.2–82.5) %	
Presumed IP		
AR IH (<i>n</i> = 7)	62.5 (25–100) %	0.084*
AD IH (<i>n</i> = 3)	46 (9.5–74.2) %	
AR and AD (<i>n</i> = 23)	37.7 (18–94.4) %	
Presumed IP and previous workup		
AR IH and at least FRDA (<i>n</i> = 4)	47.7 (25–100) %	0.105*
AR and/or AD with main SCAs with or without FRDA (<i>n</i> = 22)	37.7 (15–94.4) %	
AR and/or AD without TRE (<i>n</i> = 4)	71.25 (18–82.5) %	
Age at onset of ataxia		
All age groups (<i>n</i> = 20)	38.2 (9.5–94.4) %	0.354*
Early onset (<i>n</i> = 8)	46.6 (21–74.2) %	
Late onset (<i>n</i> = 5)	54.5 (21.4–100) %	
Family history of ataxia		
Sporadic ataxia > 50% (17)	33.2 (18–60) %	0.368**
FH > 50% (7)	40.9 (9.5–100) %	
Consanguinity		
> 0% (9)	52.4 (25–100) %	0.009**
No or < 10% (17)	32 (9.5–74.2) %	
NGS workup		
TP (<i>n</i> = 13)	46 (9.9–82.5) %	0.242*
ES (<i>n</i> = 12)	41.9 (21–100) %	
Stepwise approach (<i>n</i> = 8)	40.3 (15–94.4) %	
Cohort selection		
Unselected (<i>n</i> = 11)	35.5 (18–65) %	0.069*
Selected (<i>n</i> = 18)	40.5 (9.5–100) %	0.098**,+
Phenotype-specific (<i>n</i> = 4)	48.4 (46–80) %	0.039**,,+

*Kruskal Wallis test, significant *p* (<0.05)

**Mann-Whitney test, *p* significant (<0.05)

+Between selected and phenotype-specific samples

++Between unselected and phenotype-specific samples

The values in bold indicate statistical significance >95%

Table 3 – Previsibility of the inheritance pattern according to clinical data

Study	Main features	Family history	Inheritance pattern (diagnosis)	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
Arslan EA	Extensively prescreened cohort	-	AR 100%	100	-	100	-
Cheng HL	Heterogeneous; extensively prescreened cohort; mostly sporadic and onset < 40 yo	22%	AR 100%	100	-	100	-
Coutelier M	Prescreened according to phenotype	31%	AR 81%; AD 19%	5.1	100	100	44.8
Coutelier M	Prescreened according to phenotype	>95%	AR 23%; AD 76%	50	0	50	0
Dong HL	Mitochondrial DNA (and nDNA) sequenced extensively prescreened cohort	60%	AR 0%; AD 0%; X-link 20%; mtDNA 80%	0	100	50	-
Hadjivassiliou M	Heterogeneous; extensively prescreened cohort Stepwise: acquired causes and TRE --> NGS	48.7%	AR 17.5%; AD 82.6%	10.9	0	11.6	0
Hamza W	High consanguinity Stepwise approach: FRDA --> NGS	26%	AR 100%	100	-	100	-
Ignatius E	Childhood-onset ataxias (0-5 yo)	22%	AR 45%; AD 55%	46.2	57.1	66.7	36.4
Krygier M	Sporadic ataxia with early onset (onset < 30 yo)	30%	AR 100%	33.3	-	100	0
Mutlu-Albayrak H	Childhood-onset progressive ataxia Either affected siblings or consanguinity	-	AR 100%	100	-	100	-
Németh AH	Heterogeneous; extensively prescreened cohort Either positive FH or onset < 50 yo	44%	AR 66.6%; AD 33.3%	0	100	25	-
Pyle A	Extensively prescreened cohort	59%	AR 55.5%; AD 44.5%	55.6	100	100	50
Santos M	Childhood-onset ataxia (mostly < 8 yo)	100%	AR 84%; AD 16%	84.2	0	84.2	0
Sawyer SL	Pediatric-onset ataxia; extensively prescreened cohort	47%	AR 77%; AD 23%	76.9	0	76.9	0
Shakya S	Early-onset ataxia (before 25yo)	36.7%	AR 100%	100	0	100	0
Valence S	Congenital (non-progressive) ataxia	5%	AR 75%; AD 25%	75	0	75	0
Vural A	Stepwise approach (TRE --> NGS)	88%	AR 95%; AD 5%	79.6	100	100	18.5
All studies	-	-	-	60.1	49.5	77.9	29.6

The values in bold indicate statistical significance >95%

FIGURES

Figure 1. PRISMA flow diagram of study screening and selection

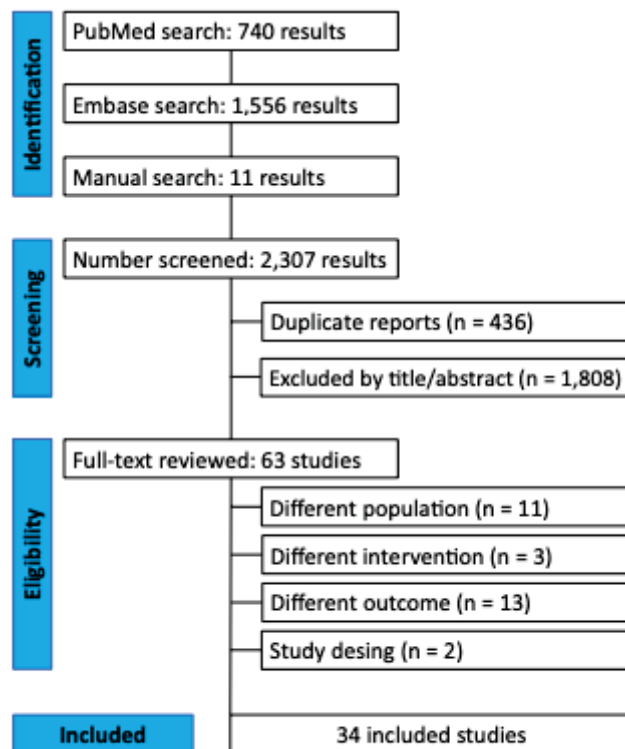
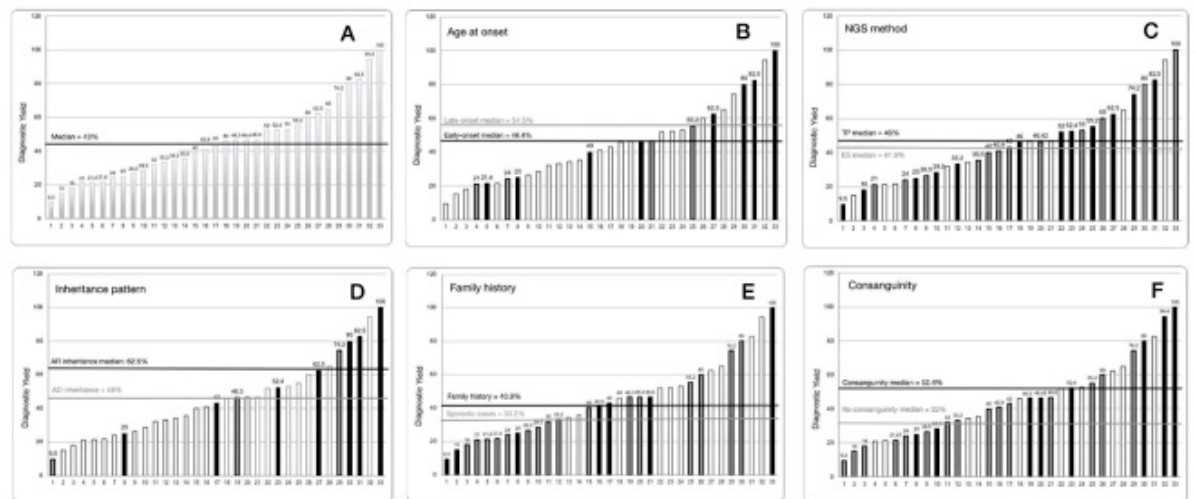


Fig. 1 PRISMA flow diagram of study screening and selection

Figure 2. Number of articles included in this systematic review by continent



Figure 3. Diagnostic yield (DY) of the selected articles



Legend: A - All included articles (33); B - Studies that used targeted panels (TP) (12); C - Studies that used more than one type of next-generation sequencing (NGS) (9); D - Studies that used exome sequencing (ES) (12).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta revisão alcançou os objetivos propostos e permitiu um olhar amplo sobre o RD de testes que utilizam o NGS para o diagnóstico de AH. Poderá ser utilizada como ferramenta para aconselhamento genético e melhor tomada de decisão por parte dos profissionais de saúde e dos indivíduos afetados.

Decidimos realizar uma revisão mais ampla para ter uma visão geral do que foi publicado a respeito do rendimento diagnóstico para indivíduos com AH. Por esse motivo, resumos de conferências e de congressos foram incluídos e representaram quase $\frac{1}{3}$ dos estudos que tiveram dados extraídos. Essas publicações eram informativas sobre o RD mas continham poucas informações adicionais. Também incluímos artigos que descreviam vários distúrbios neurológicos, incluindo ataxia hereditária; em várias publicações, os dados tiveram que ser cuidadosamente extraídos de materiais suplementares e o fenótipo dos indivíduos atáxicos não foi detalhado. Para permitir esta revisão, incluímos diferentes PG (genes diferentes) e SE (exoma clínico e sequenciamento do exoma completo). A maioria dos estudos primários não descreveu em detalhes as informações clínicas dos pacientes atáxicos testados e usou o termo “história familiar positiva” não especificando o padrão de herança. Além disso, os estudos tinham métodos diferentes para a seleção dos participantes e critérios de inclusão diferentes. Os estudos primários foram altamente diversificados em aspectos como seleção e características da população e técnicas de NGS (especialmente genes testados em PG). Essa heterogeneidade não era compatível com uma metanálise, que não foi realizada. O grande número de publicações analisadas, bem como esta variabilidade em vários aspectos, tornou esta revisão mais robusta mas também criou uma limitação. A própria natureza desta revisão sistemática aumentou o risco de viés em estudos primários, uma vez que eram principalmente séries de casos e relatos de casos. O viés de seleção é uma preocupação, especialmente porque a maioria dos artigos não descreveu claramente os critérios de inclusão e exclusão.

REFERÊNCIAS

- ANHEIM, M. et al. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: Implications for clinical management. **Neurogenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 14 fev. 2010.
- ASHIZAWA, T.; XIA, G. Ataxia. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 22, n. 4, Movement Disorders, p. 1208–1226, 1 ago. 2016.
- BEAUDIN, M. et al. Systematic review of autosomal recessive ataxias and proposal for a classification. **Cerebellum and Ataxias**, v. 4, p. 1–12, 2017.
- BEREZNYAKOVA, O.; DUPRÉ, N. Spastic ataxias. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 155p. 191–203.
- BIRD, T. D. **Hereditary Ataxia Overview** GeneReviews®. [s.l.] University of Washington, Seattle, 25 jul. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301317>>. Acesso em: 12 nov. 2020.
- CAMPBELL, W. W. **DeJong's the Neurologic Examination**. 6th. ed. Philadelphia: [s.n.].
- CHOI, K.-D.; CHOI, J.-H. Episodic Ataxias: Clinical and Genetic Features. **Journal of Movement Disorders**, v. 9, n. 3, p. 129–135, 25 set. 2016.
- DA POZZO, P. et al. A novel mutation in the mitochondrial tRNA^{Pro} gene associated with late-onset ataxia, retinitis pigmentosa, deafness, leukoencephalopathy and complex I deficiency. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 8, p. 1092–1096, 18 ago. 2009.
- EMBIRUÇU, E. K. et al. Autosomal Recessive Ataxias. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 67, n. 4, p. 1143–1156, 2009.
- FUSSIGER, H. **ATAXIA DE FRIEDREICH: DA SUSPEITA CLÍNICA AO DIAGNÓSTICO DEFINITIVO**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2017.
- GALATOLO, D. et al. Clinical application of next generation sequencing in hereditary spinocerebellar ataxia: increasing the diagnostic yield and broadening the ataxia-spasticity spectrum. A retrospective analysis. **Neurogenetics**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2018.
- GIOCONDO, F.; CURCIO, G. Spinocerebellar ataxia: a critical review of cognitive and socio-cognitive deficits. **International Journal of Neuroscience**, v. 128, n. 2, p.

182–191, 1 fev. 2018.

JAYADEV, S.; BIRD, T. D. Hereditary ataxias: Overview. **Genetics in Medicine**, v. 15, n. 9, p. 673–683, 28 set. 2013.

KOBOLDT, D. C. et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 27, 26 set. 2013.

LI, H. et al. [Clinical and genetic study of a family affected with spinocerebellar ataxia 3 and polycystic kidney disease]. **Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics**, v. 32, n. 1, p. 60–63, fev. 2015.

MARTORELL, L. et al. The repeat expansion detection method in the analysis of diseases with CAG/CTG repeat expansion: Usefulness and limitations. **Human Mutation**, v. 10, n. 6, p. 486–488, 1997.

MONDAL, B. et al. An update on Spino-cerebellar ataxias. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 16, n. 3, p. 295–303, jul. 2013.

NACHBAUER, W.; EIGENTLER, A.; BOESCH, S. Acquired ataxias: the clinical spectrum, diagnosis and management. **Journal of Neurology**, v. 262, n. 5, p. 1385–1393, 26 maio 2015.

PALMA, J. A.; NORCLIFFE-KAUFMANN, L.; KAUFMANN, H. Diagnosis of multiple system atrophy. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 211, p. 15–25, 1 maio 2018.

PANDOLFO, M.; MANTO, M. Cerebellar and afferent ataxias. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 19, n. 5, p. 1312–1343, out. 2013.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424, 8 maio 2015.

ROPPER, A. H.; SAMUELS, M. A. **Adams and Victor's principles of neurology**. 10. ed. New York, N.Y.: McGraw Hill Medical, 2014.

RUANO, L. et al. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: A systematic review of prevalence studies. **Neuroepidemiology**, v. 42, n. 3, p. 174–183, 2014.

SANDFORD, E.; BURMEISTER, M. Genes and genetic testing in hereditary ataxias. **Genes**, v. 5, n. 3, p. 586–603, 2014.

SUN, L. et al. Report of progressive myoclonus ataxia (PMA) in two Chinese

pedigrees. **Neurological Research**, v. 38, n. 10, p. 893–896, 2016.

TEIVE, H. A. G. et al. The Geographic Diversity of Spinocerebellar Ataxias (SCAs) in the Americas: A Systematic Review. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 6, n. 7, p. 531–540, 1 set. 2019.

TETREAULT, M. et al. Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: Current challenges and future opportunities. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 6, p. 749–760, 1 jun. 2015.

WEISS, M. M. et al. Best Practice Guidelines for the Use of Next-Generation Sequencing Applications in Genome Diagnostics: A National Collaborative Study of Dutch Genome Diagnostic Laboratories. 2013.

XUE, Y. et al. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome. 2015.

YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of clinical next-generation sequencing. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 11, p. 1544–1557, 1 nov. 2017.

ZANNI, G.; BERTINI, E. X-linked ataxias. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 155p. 175–189.