

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Reporte de servicio social en el Instituto Nacional De
Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

Identificación de moléculas asociadas al RNA mutante de ataxina 7 en modelos celulares de ataxia espinoocerebelosa tipo 7

Fecha de inicio: 17 de octubre de 2022
Fecha de conclusión: 17 de mayo de 2022

Asesores

Asesor interno: Dr. Azaola Espinosa Alejandro Alberto
Asesor externo: Dr. Hernández Hernández Oscar



Alumno

Ruvalcaba Gómez Ernesto

Ciudad de México, a 6 de noviembre de 2023

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Marco teórico.....	4
2.1 Generalidades de la ataxia espinocerebelosa y clasificaciones	4
2.2 Ataxia espinocerebelosa tipo 7.....	5
2.2.1 Prevalencia y epidemiología.....	6
2.2.2 Mutación en el gen <i>ATXN7</i>	6
2.2.3 Características clínicas y alteraciones celulares	7
2.3 Bases moleculares de SCA7	11
2.3.1 Papel de la ataxina 7.....	11
2.3.2 Toxicidad de la ataxina 7 mutante	13
2.4 Ganancia de función tóxica por RNA mutante	13
2.5 Territorios nucleares.....	15
2.5.1 Speckles nucleares	16
2.5.2 Cuerpos de Cajal.....	17
2.5.3 Nucléolo	19
2.5.4 hnRNPL.....	21
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. Justificación.....	24
5. Hipótesis	24
6. Materiales y Métodos.....	25
5.1 Cultivo de células.....	25
5.2 Transfección transitoria.....	25
5.4 Preparación de cDNA.....	26
5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
5.6 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente para RNA (RNA-FISH).....	27
5.7 Inmunofluorescencia	27
5.8 RNA-FISH acoplado a inmunofluorescencia	28
7. Resultados.....	29
8. Discusión	38

9. Conclusión	43
Referencias	44
Anexos	53

Resumen

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por efectos deletéreos en cerebelo y retina. Esta enfermedad es causada por expansión de CAG en el gen *ATXN7*, codificando trectos de poliglutaminas (polyQ) en la proteína ataxina-7. Se ha documentado que la ataxina-7 mutante provoca afectación cerebelar en la capa de células de Purkinje, así afectando en glía de Bergmann, sin embargo, en la retina se desconoce el papel de la ataxina-7 mutante en células de glía de Müller. La patogénesis de SCA7 se da por el mecanismo de ganancia de función de la proteína, sin embargo, no se descarta la contribución del RNA mutante a la enfermedad. Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación del RNA mensajero mutante de *ATXN7* con proteínas de territorios nucleares en modelos celulares de SCA7. Se usó la línea celular glial de Müller, MIO-M1, y por medio de la técnica de RNA-FISH se observó la formación de agregados nucleares del RNA mutante en células MIO-M1 64Q. Para determinar la co-localización del mRNA con proteínas específicas de territorios sub-nucleares en las células MIO-M1 64Q, se usó la técnica de RNA FISH acoplado a inmunofluorescencia, en donde se encontró una posible co-localización entre los focos nucleares con fibrilarina y la ribonucleoproteína nuclear heterogénea tipo L (hnRNPL). Fibrilarina es una proteína nucleolar asociada con la modificación del precursor de rRNA; los RNA mutantes de CAG interfieren con la función nucleolar, desregulando la biogénesis de ribosomas. Por otro lado, hnRNPL es una proteína de unión al RNA que se encuentra enriquecida en el núcleo y tiene una mayor afinidad a unirse a elementos de RNA ricos en CA, por lo que probablemente hnRNPL se une a los mRNA mutantes y esta proteína deja de fungir su papel como factor de empalme de intrones del mRNA de Bcl-2, así reduciendo los niveles de éste y desencadenando la apoptosis.

Palabras clave: SCA7, gen *ATXN7*, glía de Müller, polyQ, focos nucleares, MIO M1, RNA FISH, RNA FISH acoplado a inmunofluorescencia, fibrilarina, hnRNPL, precursor de rRNA, Bcl-2.

1. Introducción

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es una enfermedad neurodegenerativa causada por expansión de repetidos CAG en el gen *ATXN7*, con efectos deletéreos en cerebelo y retina. Asimismo, la SCA7 es parte de la gran familia de ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA), y se estima que representa del 1 al 11.7% de ADCAs en diferentes poblaciones del mundo, sin embargo, se ha observado que es mayor la frecuencia de la enfermedad en Escandinavia, Corea, Sudáfrica y México (Trottier *et al.*, 1995; Magaña *et al.*, 2014).

La mutación causante de SCA7 se identificó en 1995 y el gen *ATXN7* se aisló en 1998, donde se demostró que contenía una repetición CAG polimórfica en la secuencia codificante del gen *ATXN7* en el cromosoma 3. Los alelos de tipo salvaje de *ATXN7* tienen entre 4 a 36 repeticiones CAG, mientras que los alelos patológicos suelen tener más de 36 CAG e incluso pueden alcanzar repeticiones mayores a 460; las expansiones más grandes en SCA7 se asocian con un inicio más temprano de la enfermedad con síntomas más graves y una progresión más rápida, por otro lado, entre más pequeñas sean las repeticiones los síntomas se presentan a edad más avanzada (Stevanin *et al.*, 1999; Karam & Trottier, 2018). La ataxina-7, codificada por el gen *ATXN7*, es una proteína que se expresa en muchos tejidos, incluido el sistema nervioso central, sin embargo, su mutación conduce a la muerte neuronal selectiva solo en el cerebelo y la retina. Los repetidos CAG en el gen *ATXN7* codifican para un tracto de poliglutaminas (polyQ), que a partir del alelo mutante provocan que la proteína ataxina-7 sea tóxica a través de procesos de agregación de proteínas y muerte de un subconjunto de neuronas vulnerables en el cerebro de pacientes con SCA7 (Lebre & Brice, 2003).

A la fecha, las alteraciones celulares y moleculares en SCA7 se han explicado a partir de mecanismos de ganancia de función de la proteína mutante, sin embargo, la participación del RNA mensajero en la patogénesis de la enfermedad no se ha abordado. Con la intención de abordar la hipótesis de la participación del RNA mutante en SCA7, el presente trabajo plantea el estudio de la formación de

agregados de RNA mutante del gen *ATXN7* y su asociación con proteínas de territorios nucleares, utilizando un modelo celular glial inducible de SCA7.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de la ataxia espinocerebelosa y clasificaciones

Las ataxias espinocerebelosas (SCA, por sus siglas en inglés) son un subconjunto de ataxias cerebelosas hereditarias que se transmiten de forma autosómica dominante. Estas se caracterizan por ser enfermedades neurodegenerativas progresivas que afectan principalmente al cerebelo, sin embargo, también pueden afectar a otras regiones como el tronco encefálico (Sullivan *et al.*, 2019)

Según los autores anteriormente mencionado Según Dueñas y colaboradores (2016), desde el año 1928, Harding propuso la clasificación de las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA's) con base en el cuadro clínico, y clasificó este conjunto de desórdenes en tres grupos principales. En la Tabla 1 se presenta dicha clasificación, así como las características neuropatológicas más relevantes.

Tabla 1. Clasificación de las SCA

Tipo de ADCA	Presentación clínica	Neuropatología	SCA asociadas	Estudio
ADCA I	Síndrome cerebelar con oftalmoplejía/piramidal/signos extrapiramidales/deterioro cognoscitivo/neuropatía.	Degeneración del cerebelo, de ganglios basales/córtex cerebral/nervio óptico/sistema ponto medular tractos espinales/nervios periferales.	SCA 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 19/22, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, DRPLA	Worth <i>et al.</i> , (2000); Klockgether, Mariotti & Paulson (2019); Lin <i>et al.</i> , (2000)
ADCA II	Síndrome cerebelar con retinopatía pigmentaria.	Degeneración cerebelar, pigmentaria y retinal.	SCA 7	Giunti <i>et al.</i> , (1999)
ADCA III	Síndrome cerebelar puro.	Degeneración cerebelar.	SCA 5, 6, 11, 14, 15, 16, 26	Yabe <i>et al.</i> , (2001); Dueñas <i>et al.</i> , (2006)

2.2.1 Prevalencia y epidemiología

Las ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes son trastornos muy raros con una prevalencia de 0.3 a 2% por cada 100,000 habitantes. Específicamente, SCA7 representa del 1% al 11.7% de los casos entre las condiciones genéticamente identificadas, con una incidencia mundial de $1 < 100,000$. Entre los países con más prevalencia de la enfermedad se encuentran Estados Unidos de América, España, Australia, China, Italia, India, Japón, Taiwán, Corea, Brasil, Países Bajos, entre otros (van de Warrenburg *et al.*, 2001; Martin, 2012) Por otro lado, en la región central del estado de Veracruz, en México, se ha reportado una prevalencia inusualmente elevada de 0.66, 90.31 e incluso de 817.14 casos de SCA7 por cada 100,00 habitantes en las poblaciones de Xalapa, Cosautlán y Tlaltetela, respectivamente, debida a un efecto fundador (Magaña *et al.*, 2013; Magaña *et al.*, 2014).

2.2.2 Mutación en el gen *ATXN7*

Como se mencionó anteriormente, en SCA7 el tracto de repetidos CAG es polimórfico y se presenta en un rango de 4 a 36 repetidos CAG en el gen *ATXN7* en la población general, mientras que en los pacientes se presentan de 37 a 460 repetidos. Las manifestaciones clínicas son variables, con fenotipos leves de aparición en edad adulta que se asocian con 37 a 55 repeticiones, y con fenotipos más severos, de aparición en edades tempranas, asociados con expansiones CAG largas (van de Warrenburg *et al.*, 2001; Niewiadomska & Trottier, 2019).

Además, Goswami y colaboradores (2022), documentaron que las repeticiones mayores a 70 repeticiones de CAG dan como resultado formas de inicio juvenil con un curso acelerado de la enfermedad. Por otro lado, las expansiones de CAG demasiado grandes, mayores a 100 repeticiones de CAG, causan formas infantiles con trastornos multisistémicos como retraso en el crecimiento, hipotonía, convulsiones mioclónicas, así como insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal y atrofia muscular, lo que conduce a la muerte en pocos años o meses del nacimiento.

2.2.3 Características clínicas y alteraciones celulares

Según Gómez y colaboradores (2017), en la SCA7 se manifiesta la incapacidad para coordinar el equilibrio, la marcha y el habla; además, se acompaña de otras características neurológicas, que incluyen síntomas piramidales, trastornos oculomotores, neuropatía periférica, deterioro cognitivo y trastornos del sueño; en ocasiones, se podrían desarrollar déficits neurológicos más extensos que incluyen disfagia, hipoacusia y disartria.

- Alteración cerebelar

La pérdida neuronal es sustancial en la capa de células de Purkinje (PC) en el cerebelo, en los núcleos dentados, en los núcleos olivares inferiores y en la base del puente, lo que se asocia con la atrofia de los tractos espinocerebelosos y piramidales. Además, se ha observado la presencia de atrofia o pérdida de mielina en la sustancia blanca del cerebelo y estructuras extracerebelosas asociadas (Karam & Trottier, 2018).

Estos mismos autores estudiaron en los modelos de ratón PrP-SCA7-c92Q y Gfa2-SCA7-92Q la patología cerebelar, encontrando defectos motores y degeneración en neuronas de Purkinje. En ambos modelos de SCA7, las células de la glía de Bergmann, que de igual manera expresan la ataxina 7 mutante, también muestran signos patológicos. La glía de Bergmann regula los niveles de glutamato en el entorno adyacente de las células de Purkinje, en SCA7 las células de la glía de Bergmann expresan niveles bajos del transportador de glutamato GLAST con captación disminuida y acumulación de este neurotransmisor, lo cual provoca degeneración y excitotoxicidad (Figura 2).

En otros estudios, se reveló una interacción célula-célula aún más compleja entre la glía de Bergmann, las células de Purkinje y las neuronas de la oliva inferior en la disfunción cerebelosa de SCA7 utilizando un modelo de ratón PrP floxed-SCA7-92Q BAC, en el cual la ataxina 7 mutante se expresa en todo el cerebelo. En este trabajo encontraron que a la eliminación de la ataxina 7 mutante de la glía de Bergmann tiene efectos beneficiosos leves sobre la patología y no previene la degeneración

de la glía de Bergmann. Por el contrario, la eliminación de ataxina 7 mutante de PC y de las neuronas de la oliva inferior mejora el rendimiento motor y corrige la patología de la glía de Bergmann. Finalmente, la eliminación de ataxina 7 mutante en los tres tipos de células es más efectiva para prevenir la patología (Niewiadomska & Trottier, 2019).

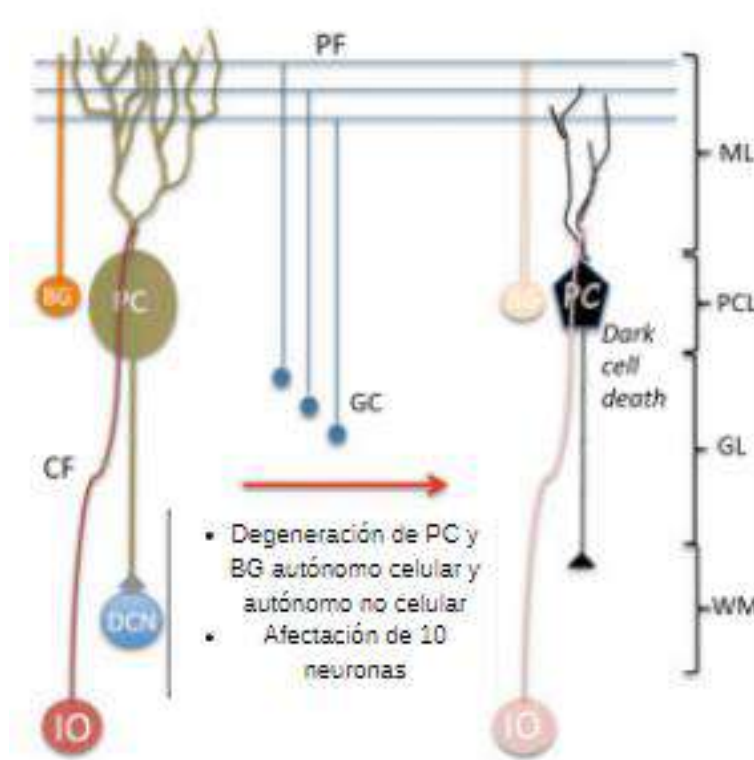


Figura 2. Esquema de la principal vía degenerativa de las neuronas de Purkinje en ratones SCA 7.

Donde: PC, célula de Purkinje; BG, glía de Bergmann; IO, oliva inferior; GC, célula granular; DCN, núcleos cerebelosos profundos; CF, fibra trepadora; PF, fibra paralela; GL, capa granular; ML, capa molecular; PCL, capa de células de Purkinje; WM, sustancia blanca. Adaptado de: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7 (p. 209), por Karam & Trottier (2018). *Adv Exp Med Biol*, 1049.

- Alteración retinal

Como se mencionó anteriormente, SCA7 tiene la característica única entre las enfermedades polyQ de causar una degeneración retiniana; en este proceso se afectan primero los fotorreceptores tipo conos y luego se afectan los bastones, evolucionando finalmente a ceguera completa. En el análisis de fondo del ojo se detecta mácula atrófica con pigmentación granular, áreas pálidas con atrofia pigmentaria y vasculatura deficiente. Por otro lado, en las secciones de retina *post-mortem* se revela una pérdida casi completa de los fotorreceptores y una pérdida sustancial de las neuronas bipolares y ganglionares, la cual está asociada con un adelgazamiento severo de la capa nuclear, especialmente en las regiones foveal y parafoveal (Yefimova *et al.*, 2010; Karam & Trottier, 2018).

De acuerdo con Karam y Trottier (2018), en modelos de SCA7, la retina desarrolla un progresivo deterioro de la retina con represión en la expresión de genes específicos de fotorreceptores. Estas alteraciones transcripcionales se deben a una disfunción de CRX (proteína homeobox de conos y bastones), que es un factor de transcripción importante en la regulación de genes en fotorreceptores. Anteriormente se ha demostrado que el factor CRX requiere la interacción con ataxina 7 y reclutada en el complejo SAGA para su actividad de transactivación en los promotores de genes fotorreceptores, y se demostró que la ataxina 7 mutante suprime la actividad de transactivación de CRX en la retina en los modelos murinos de SCA7.

Se ha documentado que existe una regulación baja de los factores de transcripción CRX, NRL (proteína con cremallera de leucina de la retina neural) y Nr2E3 (Subfamilia de Receptores Nucleares 2, Grupo E, Miembro 3) específicos de los fotorreceptores, así como la mayoría de sus genes diana. Y, por otro lado, se reactiva OPTX2, STAT3 y HES5 que normalmente inhiben la diferenciación de las neuronas precursoras en fotorreceptores maduros durante el desarrollo. Por lo que los fotorreceptores en SCA7 pierden progresivamente sus segmentos externos y la polaridad celular, además, vuelven a adoptar una forma de célula redonda.

En SCA7 existe una regresión progresiva o degeneración lenta antes de la muerte celular. Este fenómeno contrasta con la mayoría de los procesos degenerativos de fotorreceptores en ratones, donde las alteraciones en la integridad del segmento externo conducen rápidamente a la muerte celular. Así mismo, se ha reportado que los fotorreceptores pueden pasar por diferentes destinos celulares como respuesta a la toxicidad mediada por ataxina 7 mutante como es la apoptosis, remodelación celular, degeneración oscura y proliferación (Karam & Trottier, 2018; Niewiadomska & Trottier, 2019).

Si bien, se conocen los efectos tóxicos sobre los receptores, poco se conoce del efecto de la ataxina 7 mutante sobre la glía de Müller. La glía de Müller es el principal tipo de célula glial en la retina y normalmente contribuye a la estructura y la homeostasis de la retina; estas células proporcionan orientación, dan el soporte estructural y metabólico hacia neuronas retinales y previenen la migración aberrante de los fotorreceptores. Las células de Müller expresan receptores de neurotransmisores como el receptor ácido α -aminobutírico tipo B (GABAB) y varios tipos de transportadores de glutamato, esto último facilita el paso de glutamato para conservar su concentración extracelular por debajo de niveles neurotóxicos. Asimismo, estas células expresan sintetasa glutamina, una enzima que está involucrada en la detoxificación de glutamato y opera con el transportador de L-glutamato-L-aspartato (GLAST) (Limb *et al.*, 2002; Goldman, 2014).

La retina se divide en 3 capas celulares, la capa nuclear externa (ONL), la capa nuclear interna (INL) y la capa de células ganglionares (GCL). En ONL se albergan fotorreceptores, que detectan la luz y transducen esta información a las células ganglionares en el GCL a través de tres tipos de interneuronas (células bipolares, células amacrinas y células horizontales) que residen en el INL. Es importante notar que el soma de la glía de Müller reside en el INL, sin embargo, estas células abarcan todas las capas de la retina y tiene procesos que contactan con las neuronas vecinas y contribuyen a las membranas limitantes externa e interna (Goldman, 2014; Popova & Barnstable, 2019). En la Figura 3A se observa las diferentes capas de la

retina y la ubicación de la glía de Müller, en la Figura 3B se observa una sección histológica de retina adulta que muestra el grosor relativo de sus diferentes capas.

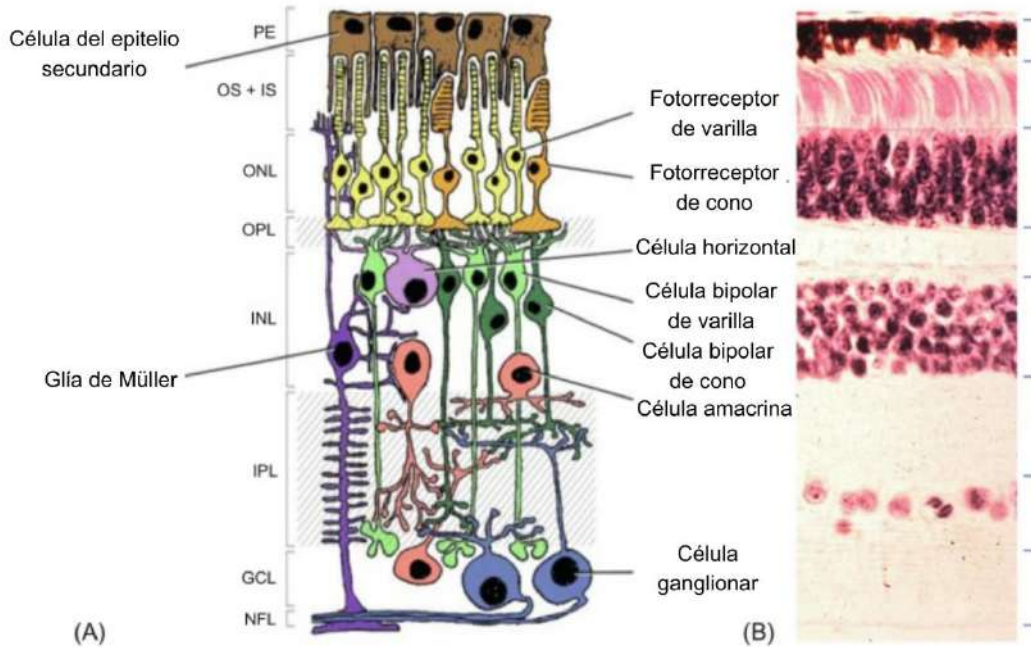


Figura 3. Estructura de la retina adulta.

Nota: PE, epitelio pigmentario de la retina; OS+IS, segmentos externo e interno de los fotorreceptores; ONL, capa nuclear externa que contiene cuerpos celulares fotorreceptores; OPL, capa plexiforme externa, donde los fotorreceptores hacen sinapsis con las interneuronas de la retina; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna, donde la red de interneuronas interactúa y finalmente forma sinapsis con las células ganglionares; GCL, capa de células ganglionares, los cuerpos celulares de las células de salida de la retina; NFL, capa de fibras nerviosas que contiene los axones de las células ganglionares y los astrocitos asociados. Adaptado de: Insights Into the Epigenetics of Retinal Development and Diseases (p.358), Popova & Granero (2019). *Epigenetics and Regeneration*, 11.

2.3 Bases moleculares de SCA7

2.3.1 Papel de la ataxina 7

Conforme a Niewiadowska y Trottier (2019), la ataxina-7 es una proteína ubicua de localización predominantemente nuclear, expresada en diferentes incluidas las células de Purkinje, en las que puede estar presente a nivel citoplasmático o nuclear. En la retina, la ataxina 7 está presente en todas las neuronas, ubicadas en los núcleos y segmentos internos de los fotorreceptores y ausente en sus segmentos externos.

Esta proteína forma parte del complejo SAGA (SPT-ADA-GCN5-acetiltransferasa), un coactivador transcripcional con actividad de deubiquitina e histona acetiltransferasa (Figura 4), presente en mamíferos y conservado en levaduras (Bonnet *et al.*, 2010; Tercero *et al.*, 2019).

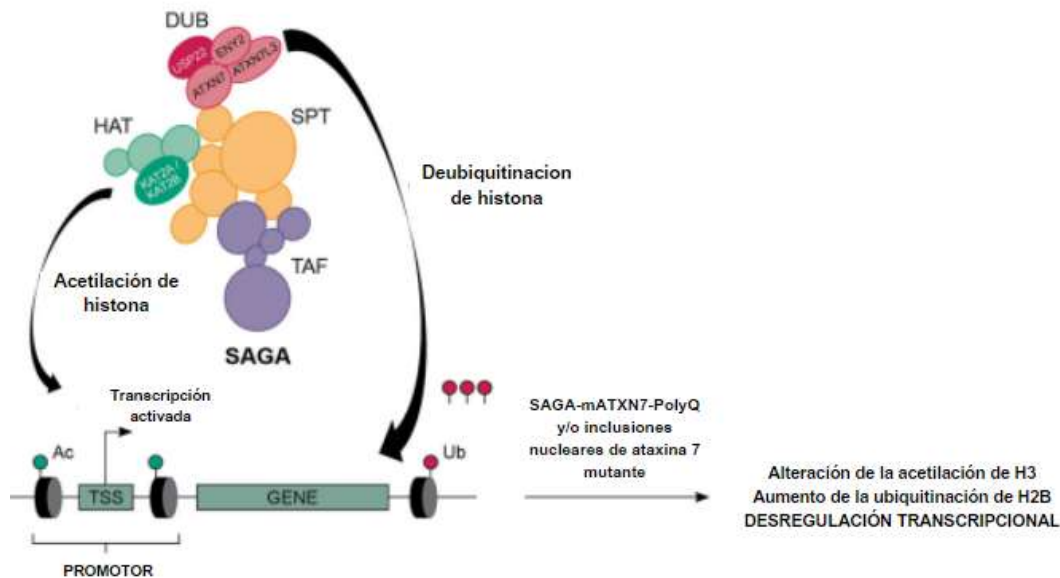


Figura 4. Complejo SAGA y sus cuatro componentes.

Adaptado de: Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7 (p. 1077), por Niewiadomska. A & Trottier, Y. (2019). *Neurotherapeutics*, 16.

El complejo SAGA se compone de cuatro módulos distintos que forman una arquitectura central responsable de la interacción con la maquinaria transcripcional y las modificaciones de la cromatina a través de las actividades de la histona acetiltransferasa (HAT) y deubiquitinasa (DUB) (Figura 4). En el módulo HAT, la acetiltransferasa KAT2A/ KAT2B acetila la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) que está ubicada en los genes promotores, permitiendo así la descompactación de la cromatina y la accesibilidad a los factores de transcripción. Mientras que en el módulo DUB, la ubiquitina proteasa USP22 elimina la monoubiquitina de la lisina 120 en la histona H2B (H2Bub) para optimizar el inicio y la elongación de la transcripción por parte de la RNA Polimerasa II (RNAPII). El complejo SAGA actúa como un coactivador para todos los genes transcritos por RNAPII. La ataxina 7

pertenece al módulo DUB y éste ancla DUB a SAGA. El dominio I de Ataxina 7 media en las interacciones entre los otros tres componentes DUB: USP22, ATXN7L3 y ENY2 en humanos (Mohan *et al.*, 2014; Karam & Trottier, 2018).

2.3.2 Toxicidad de la ataxina 7 mutante

Se ha propuesto que el tracto polyQ de la proteína ataxina 7 mutada altera la regulación transcripcional al modificar las actividades de deubiquitinasa e histona acetiltransferasa del complejo SAGA, el cual desempeña un papel central en la regulación de genes relevantes para mantener la función de fotorreceptores en la retina (Palhan *et al.*, 2005). La patogénesis de SCA7 se ha explicado tradicionalmente a través de una ganancia de función por parte de la proteína mutante, la cual es capaz de formar inclusiones nucleares en los tejidos afectados (La Spada & Taylor, 2010). Se conoce que los agregados proteicos secuestran, entre otras moléculas, a miembros del complejo SAGA y factores de ubiquitina-proteasoma (Yang *et al.*, 2015). Estos eventos tienen efectos deletéreos que incluyen estrés oxidativo sostenido, disfunción mitocondrial, activación de vías proapoptóticas, deterioro del transporte de glutamato y excitotoxicidad, lo cual en su conjunto conduce a neurodegeneración (La Spada & Taylor, 2010; Karam & Trottier, 2018).

2.4 Ganancia de función tóxica por RNA mutante

Se han propuesto varias hipótesis no exclusivas para explicar cómo las expansiones repetidas dan lugar a la neurotoxicidad en las enfermedades poliQ. Además de las alteraciones provocadas por la proteína mutante con se ha propuesto que el RNA mutante, que contienen repeticiones expandidas, puede traducirse de forma no canónica para producir péptidos cortos que pueden dar lugar a neurotoxicidad. Así mismo, el RNA que contiene repeticiones CAG puede acumularse en el núcleo formando agregados aberrantes, descritos como foci, que secuestran varias proteínas de unión al RNA, dando como resultado una alteración potencial de la homeostasis celular (Jain & Vale, 2017).

Como se indicó anteriormente, se reconoce a la ataxina-7 mutante como el factor patógeno en SCA7, sin embargo, sólida evidencia experimental sugiere que las repeticiones expandidas pueden ejercer efectos patogénicos significativos a través de una ganancia de función por parte del RNA mutante (Figura 5). La expresión del RNA a partir de genes con mutaciones dinámicas del tipo CAG da como resultado alteración en la regulación de la expresión génica a través de efectos sobre el splicing o procesamiento alternativo de transcritos, exportación nuclear alterada, defcetos en la biogénesis de microRNAs (miRNAs) y eventos de interferencia de RNA y poliadenilación aberrantes, así como traducción no AUG asociada a tripletes repetidos (traducción de RAN) (Urbanek *et al.*, 2016; Urbanek & Krzyzosiak, 2016).

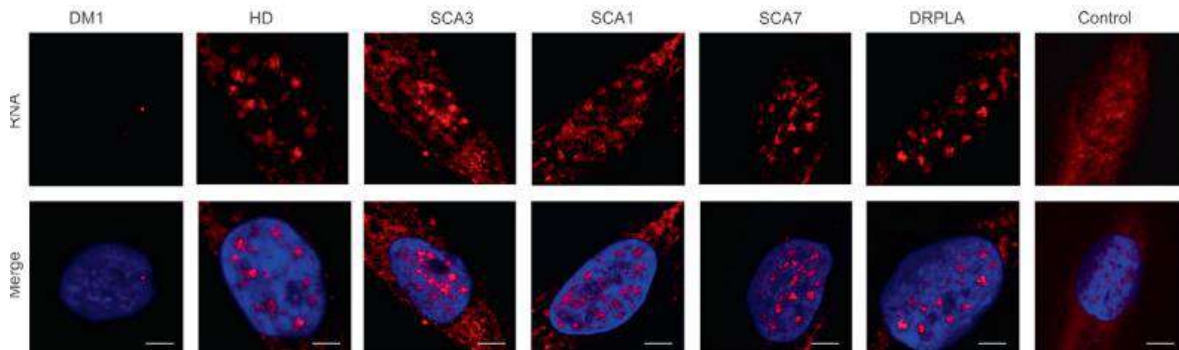


Figura 5. Formación de focos nucleares de ARN en enfermedades poliQ.

Nota: DM1, distrofia miotónica tipo 1; HD, enfermedad de Huntington; SCA 1,3 y 7 ataxia espinocerebelosa tipo 1, 3 y 7; DPRLA, atrofia dentorrubral-palidoluisiana
Adaptado de: RNA FISH for detecting expanded repeats in human diseases. (p. 121). Urbanek, M. & Krzyzosiak, J. (2016). *Methods* 98.

En analogía, el mecanismo de toxicidad por RNA se ha descrito ampliamente para la distrofia miotónica tipo 1 (DM1), una enfermedad causada por la expansión de CTG en la región 3' no traducida del gen *DMPK*. En la DM1, el RNA mutante se presenta en agregados o focos nucleares que desencadenan el secuestro/alteración funcional de proteínas reguladoras del splicing alternativo. El mal funcionamiento de estas proteínas produce un splicing aberrante de múltiples genes, lo cual contribuye al fenotipo de la enfermedad (Sicot & Gomes, 2013). En este contexto, se ha demostrado que la expresión de RNAs no traducidos que contienen repetidos CAG causa neurodegeneración en un modelo de *D.*

melanogaster y *C. elegans*, demostrando que el RNA con repetidos CAG expandidos puede dar lugar a toxicidad (Li *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

Evidencia adicional fue aportada por Wojciechowska y Krzyzosiak en 2011, quienes reportaron, en organismos modelo con repeticiones CAG de longitud patógena y no traducidas, la formación de focos intranucleares de RNA acompañada de anomalías en el ojo, el sistema nervioso y tejido muscular.

Así mismo, en un ratón transgénico que expresa 200 repeticiones de CAG en la región 3' no traducida (3'UTR) de la proteína reportera verde fluorescente (EGFP), se encontró toxicidad en el tejido muscular en ausencia del producto proteico polyQ y solo en presencia del transcrito (Hsu *et al.*, 2011). Las repeticiones CAG expandidas también se han encontrado de focos intranucleares de RNA positivos para la proteína de splicing MBNL1, con splicing alternativo aberrante en fibroblastos derivados de pacientes con enfermedad de Huntington y SCA3 (Urbanek *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2008; Marti, 2016).

En un estudio realizado por Suárez y colaboradores (2022), utilizaron la línea celular MIO-M1, con expresión de ataxina-7 portando un tracto de 64 glutaminas, encontramos agregados nucleares y citoplásmicos del RNA mutante, así como alteraciones de splicing alternativo de los genes MAPT y MBNL1.

Las células MIO-M1 derivan de células de Müller retinianas humanas (Limb *et al.* 2002), expresan marcadores específicos como EGF-R, glutamato sintetasa, CRALBP y α -SMA, y se han utilizado para estudiar el papel de las células de Müller en condiciones normales y patológicas (Limb *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2007).

2.5 Territorios nucleares

La organización espacial en el núcleo es fundamental para mantener la estructura y las funciones celulares. Para ello, las macromoléculas en las regiones de intercromatina, predominantemente proteínas y RNAs, se organizan dentro de subcompartimentos nucleares entre los que se encuentran el nucléolo, los speckles

nucleares (NS), los paraspeckles y los cuerpos de Cajal. Existe además un intercambio de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma, así como un movimiento y niveles estrictamente controlados de factores nucleares para cumplir su función de regulación, incluida la maduración de los RNAs (Dundr & Misteli, 2010; Galganski *et al.*, 2017).

2.5.1 Speckles nucleares

En las células de mamíferos, la maquinaria de splicing, o corte y empalme, del RNA pre-mensajero, incluidas las pequeñas partículas de ribonucleoproteína nuclear (snRNP), las subunidades de empalmesomas y otros factores de corte y empalme de proteínas que no son snRNP, muestra un patrón dinámico de localización nuclear punteado que generalmente es denominado "patrón speckled" (Lamond & Spector, 2003). Debido a que el empalme alternativo de pre-ARNm aumenta en gran medida la diversidad del transcriptoma en los eucariotas, los cuerpos nucleares involucrados en la regulación del empalme son reguladores clave de la expresión génica, entre estos cuerpos se incluyen los speckles nucleares (NS) (Galganski *et al.*, 2017).

Por definición los NS son dominios nucleares enriquecidos en pre-ARNm de factores de empalme, ubicados en la región de la intercromatina del nucleoplasma de las células de los mamíferos, además, los speckles nucleares son estructuras altamente dinámicas, que pueden responder a la activación de genes cercanos, y que se remodelan tras la inhibición del empalme (Ilik & Aktas, 2022). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que las proteínas involucradas en la localización cromosómica, la modificación de la cromatina, la transcripción, el empalme, el procesamiento del extremo 3', el recubrimiento del mRNA con proteínas y la exportación de ribonucleoproteína mensajera (mRNP) se ensamblan en NS (Figura

6), lo que indica que los NS son cruciales para coordinar la expresión génica nuclear (Galganski *et al.*, 2017).

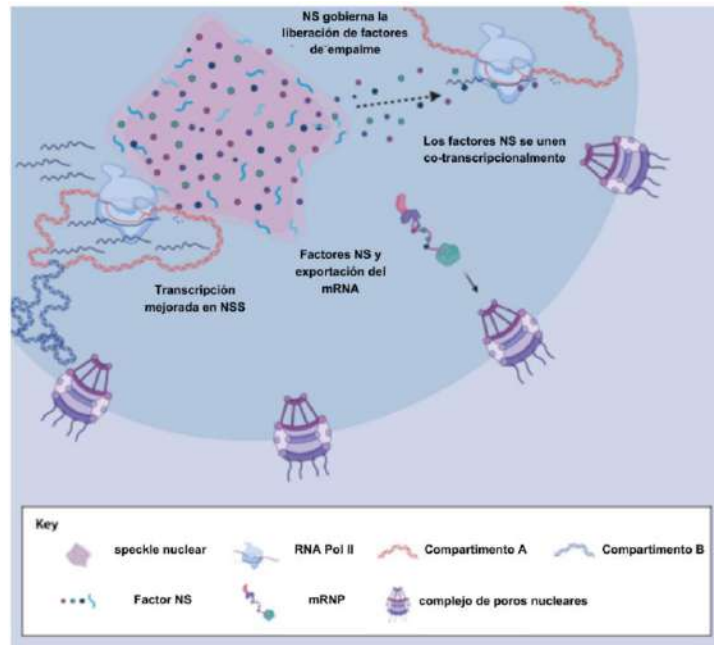


Figura 6. Función de los speckles nucleares

Adaptado de: Nuclear speckles – a driving force in gene expression (p. 2) por Faber, G., *et al.* (2022), *Journal of Cell Science*, 135(13).

2.5.2 Cuerpos de Cajal

Los cuerpos de Cajal (CB) son estructuras subnucleares altamente conservadas que se encuentran física y funcionalmente asociadas con el nucléolo, además, son estructuras dinámicas sin membrana que pueden dividirse en cuerpos secundarios o fusionarse, localizarse en nucléolos o trasladarse a otras partes del núcleo. Los CB son los sitios de modificación inicial y ensamblaje de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP), recién importados del citoplasma por el complejo SMN (proteína de supervivencia de la motoneurona, por sus siglas en inglés) o reciclados dentro del núcleo (Morris, 2008; Love *et al.*, 2017).

Además, de acuerdo con Stępiński (2020), en los CB se han identificado varias clases de RNA no codificantes (ncRNA) en forma de intermediarios transitorios de ribonucleoproteína (RNP), así como de RNP maduros listos para exportarse a los sitios de acción. Entre estos ncRNA hay pequeños RNA nucleares (snRNA) que incluyen snRNA spliceosomales involucrados en el empalme de pre-mRNA, por lo

tanto, los CB tienen un papel relevante en coordinar la biosíntesis de estos snRNA, proporcionando el microambiente específico que aumenta la eficiencia de los procesos asociados con su maduración y modificaciones.

La proteína SMN se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, sin embargo, en el núcleo se acumula en estructuras nucleares conocidas como gemas, las cuales están asociadas con los CB (Hebert *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2014). Como se comentó anteriormente, los CB desempeñan un papel en el transporte y la maduración de snRNP. Los snRNP consisten en un RNA nuclear pequeño (snRNA), un anillo de siete proteínas Sm o Like-Sm (LSm) y varias otras proteínas, que se nombran por el snRNA que contienen: U1, U2, U3 U4, U5 y U6. Las SnRNP se ensamblan en el citoplasma, donde SMN desempeña un papel esencial en la formación de anillos ordenada y escalonada de proteínas llamadas: Sm B/B', D3, D1, D2, E, F y G, las cuales forman el “complejo SMN” (Figura 7). Después de la importación nuclear, las snRNP se dirigen a los CB asociados al complejo SMN y coilina, la cual es una proteína marcadora de los CB. Los CB son el lugar donde se forman las di-snRNP intermedias U4/U6 y las tri-snRNP maduras U4/U6-U5, y donde se produce la liberación de tri-snRNP U4/U6-U5. El complejo tri-snRNP U4/U6•U5 es parte del empalmosoma, que se forma por la interacción ordenada de las snRNP tri-snRNP, U1 U2 y U3 y muchas otras proteínas. Las gemas son cuerpos nucleares desprovistos de bobinado; sin embargo, contienen SMN y su proteína interactuante Gemin2. La interacción de SMN con Gemin2 es importante para la estabilidad de las gemas nucleares. (Förthmann *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

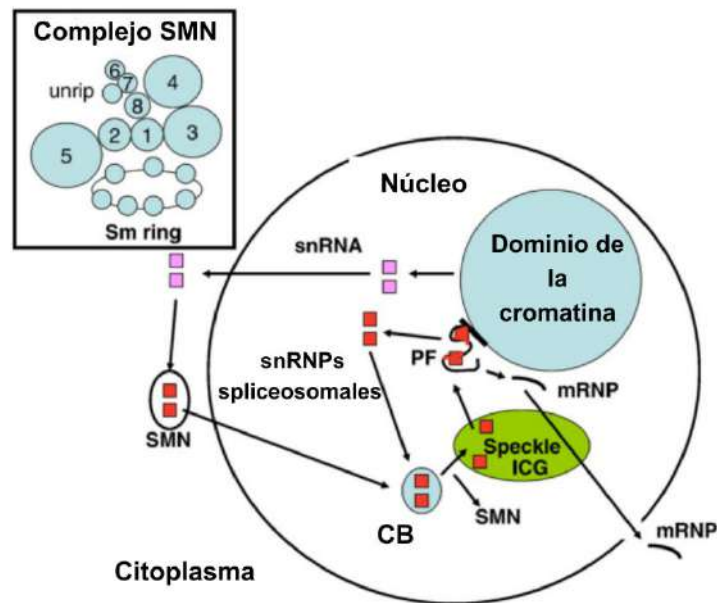


Figura 7. Composición de los CB

Adaptado de: The Cajal body. *Biochimica et Biophysica Acta* (p. 2109) por Morris, G. (2008)

Por otro lado, la coilina, la proteína distintiva de CB, parece ser esencial para la integridad y función de CB. Los CB sin coilina, también conocidos como "CB residuales", permanecen cuando se elimina experimentalmente la coilina, pero no pueden reclutar snRNP de empalme, algunos de los cuales se ubican con scaRNA en cuerpos nucleares separados. En otros estudios comprobaron que tras la eliminación dirigida de los 487 aminoácidos en C-terminales de la coilina resultó en la formación de CB residuales que carecen de SMN y Sm snRNP resaltado su importancia funcional (Hebert *et al.*, 2001; Morris, 2008; Lafarga *et al.*, 2017).

2.5.3 Nucléolo

Los nucléolos son subestructuras nucleares dinámica que están presentes en casi todos los tipos de células eucariotas y representan el compartimento más prominente del núcleo (Dubois y Boisvert, 2016). La función principal del nucléolo consiste en la transcripción del RNA ribosómico (rRNA), el procesamiento del rRNA y el ensamblaje de la subunidad del ribosoma. Asimismo, los nucleolos se ensamblan al final de la mitosis alrededor de los grupos repetidos en dúo de genes

de DNA ribosómico (rDNA) que forman así un compartimento subnuclear que recluta la maquinaria transcripcional y de procesamiento de las subunidades ribosomales.

El nucléolo concentra factores esenciales para la transcripción y/o modificación del rRNA y para el ensamblaje de subunidades de ribosomas en tres compartimentos subnucleolares: el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC) (Figura 8) (Tsoi & Chan, 2014)

El FC es el principal responsable de la transcripción de genes de rRNA; mientras que el DFC y el GC son responsables del procesamiento de transcritos precursores de rRNA (rRNA pre-45S) y del ensamblaje de subunidades de ribosomas, respectivamente. El contenido de proteínas de cada compartimento subnucleolar también refleja su función celular, por ejemplo, FC está enriquecido con la maquinaria de transcripción del RNA polimerasa I, el factor UBF (Upstream Binding Factor) y el factor de inicio de la transcripción TIF-IA (Tsoi y Chan, 2014; Martínez *et al.*, 2019).

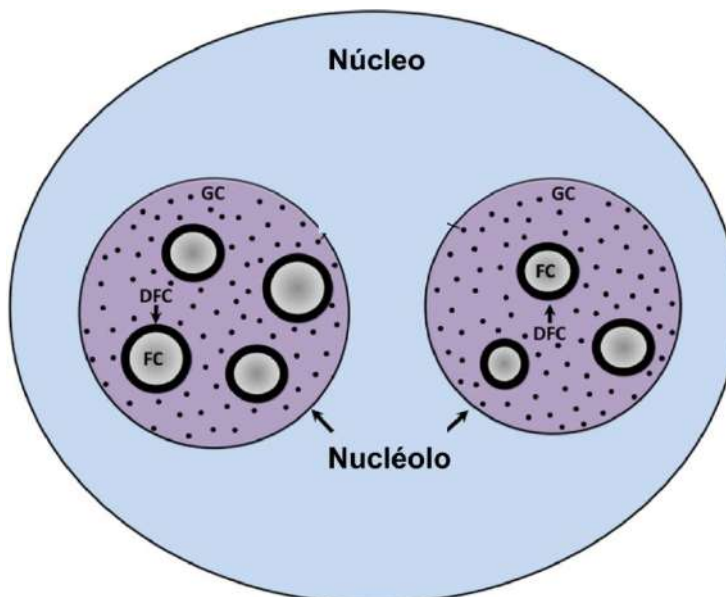


Figura 8. Estructura de los nucléolos

Adaptado de: Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa (p. 421), por Martínez, S., *et al.* (2019). *Cells*, 8(5).

Entre las proteínas que participan en la biogénesis ribosomal en el nucléolo, se encuentra la fibrilarina, específicamente ubicada dentro del DFC y en las fronteras que lo separan del FC, participando en los primeros pasos de la transcripción del pre-RNA ribosomal (Amin *et al.*, 2007; Aquino, 2016). La fibrilarina es una metiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) al grupo 2'-hidroxi de la ribosa blanco en el pre-rRNA. Se divide en dos secciones: el dominio metiltransferasa o C-terminal y el extremo N-terminal, éste último comprende un sitio rico en glicina y arginina, conocido como dominio GAR. Este dominio es metilado en sus residuos de arginina y es responsable de la interacción entre la fibrilarina con las proteínas SMN (Aquino, 2016).

Por otro lado, la nucleolina, también conocida como C23, es una proteína multifuncional que se localiza en el nucléolo, esta proteína está involucrada en varios pasos de la biogénesis de los ribosomas, incluida la transcripción del rRNA, la maduración del rRNA y el ensamblaje de los ribosomas. Hay cuatro sitios de reconocimiento de RNA (RRM) en la región central de la nucleolina que le permiten asociarse con varios tipos de moléculas de RNA. La nucleolina también se une a las secuencias de DNA del promotor del rRNA. La nucleolina regula la transcripción mediada por la ARN polimerasa I y es necesaria para el plegamiento y la maduración adecuados del ARN preribosómico (pre-ARNr), para el ensamblaje de los ribosomas y para el transporte nucleocitoplasmático (Mongelard & Bouvet, 2007; Tsoi & Chan, 2014).

2.5.4 hnRNPL

Las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP, por sus siglas en inglés) son una familia de proteínas de unión de RNA, que incluyen aproximadamente 20 proteínas con un peso molecular entre 32 y 120 kD, divididas de acuerdo con su peso molecular de hnRNP A1 a hnRNP U. La mayoría de las hnRNP's ayudan a controlar la maduración de los RNA nucleares heterogéneos recién formados en mRNA, además, estabilizan el mRNA durante su transporte celular y controlan su traducción (Geuens, Bouhy & Timmerman, 2016; Gu *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021).

hnRNPL es una ribonucleoproteína que se encuentra en fragmentos transcritos y es un componente importante del complejo nuclear hnRNP, siendo una proteína multifuncional y la más abundante de estas proteínas. Esta ribonucleoproteína se traslada del citoplasma al núcleo, sin embargo, se encuentra principalmente en el núcleo, en donde regula la síntesis, el transporte y el procesamiento del mRNA. Esta proteína se encarga de ser un regulador global en el nivel de empalme de mRNA, además, juega un papel importante en las funciones de exportación y estabilidad de mRNA de genes sin intrones. Por otro lado, se conocen ejemplos de sitios de unión de hnRNPL intrónicos para el gen *eNOS* humano, varios otros genes diana y el gen *ITGA* de ratón, asimismo, hnRNP L puede activar o reprimir exones alternativos río arriba, probablemente dependiendo de la proximidad del sitio de empalme 5'. Alternativamente, hay represión de exones en el gen *CD45*, ya que las secuencias exónicas pueden ser el objetivo de hnRNP L (Hung *et al.*, 2008; Motta, Heyd y Lynch, 2010; Gu *et al.*, 2020).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la asociación del RNA mensajero mutante de *ATXN7* con proteínas de territorios nucleares en modelos celulares de SCA7.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmar por medio de la técnica de RNA-FISH la formación de agregados nucleares de RNA mutante mediante transfecciones transitorias en células HeLa
- Determinar la co-localización del RNA mensajero mutante de SCA7 en territorios sub nucleares a través de la técnica de RNA-FISH acoplada a inmunofluorescencia en células HeLa transfectadas transitoriamente.
- Evaluar la expresión del RNA mensajero de SCA7 en el modelo celular glial MIO-M1 64Q.
- Verificar la expresión del gen *ATXN7* en el modelo MIO-M1 64Q por medio de RT-PCR.
- Confirmar mediante RNA-FISH la formación de focos nucleares en células MIO-M1 64Q
- Determinar la co-localización del RNA mutante con proteínas específicas de territorios sub-nucleares en las células MIO-M1 64Q.

4. Justificación

Actualmente no existe cura contra la SCA 7, por lo cual, el mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la patología es crucial para avanzar en propuestas efectivas de tratamiento. La proteína ataxina-7 mutante forma inclusiones nucleares que afectan la regulación transcripcional y otras funciones celulares que eventualmente llevan a la neurodegeneración. Si bien se ha reconocido el papel de la proteína mutante como el detonante de la patología en SCA7, existe evidencia experimental que sugiere la participación del RNA mensajero mutante del gen *ATXN7* como un agente tóxico capaz de formar agregados intranucleares, los cuales pueden también provocar efectos deletéreos. Por esta razón se requiere confirmar la formación de agregados nucleares de RNA mutante y determinar su ubicación en los territorios nucleares, mediante un análisis de su co-localización con proteínas nucleares.

5. Hipótesis

Los RNA mutantes con expansiones de CAG se distribuyen en el núcleo co-localizando con nucleolina, hnRNPL y coilina.

6. Materiales y Métodos

5.1 Cultivo de células

Las células HeLa, MIO-M1 WT (wild type), MIO-M1 10Q (control) y MIO-M1 64Q (mutante) se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino libre de tetraciclina al 10%, penicilina (100 U/mL), estreptomina 100 µg/mL, geneticina (350 µg/mL) y puromicina (0.35 µg/mL). Los plásmidos transfectados en células HeLa y el modelo MIOM1 se regulan mediante el sistema Tet-On (Suárez *et al.*, 2022), por ello, la expresión del RNA mutante de ataxina 7 se indujo mediante la adición de doxiciclina (2 µg/mL) durante 3 días. Las células se mantuvieron en una atmosfera de CO₂ al 5% a 37°C.

5.2 Transfección transitoria

Las células HeLa fueron transitoriamente transfectadas con plásmidos pCMV-Tet3G (2.5 µg), pTRE3G-Myc-10Q (2.5 µg) o pTRE3G-Myc-64Q (2.5 µg) usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, EUA) acorde con las instrucciones del proveedor.

5.3 Extracción, cuantificación y afirmación de integridad de RNA

Las células MIO-M1 10Q y 64Q se trataron con 0.8 mL del reactivo de TRIzol (Invitrogen 15596018), se homogenizaron por 5 minutos a temperatura ambiente, y se agregaron 0.2 ml de cloroformo por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y posteriormente se precipitó el RNA con 0.5 mL de isopropanol por 10 minutos a 4°C, se centrifugó como anteriormente se mencionó y se desechó el sobrenadante para recuperar la pastilla celular; posteriormente, se lavó con 0.75 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 8500 rpm por 10 minutos a 4°C, y se desechó el etanol. Finalmente se secó la pastilla al aire a temperatura ambiente por 5 minutos, y se resuspendió en 25 µL de agua tratada con inhibidor de RNasa DEPC. Para cuantificar se usó un espectrofotómetro Nanodrop (Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, ThermoScientific).

La integridad del RNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñida con el intercalante SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, S33102). La

separación electroforética se realizó por 45 minutos a 100V, y el gel se fotografió en un fotodocumentador de la marca BioRad.

5.4 Preparación de cDNA

Para eliminar el DNA genómico contaminante, las muestras de RNA se trataron con DNAsas, y posteriormente se prepararon diluciones a una concentración de 1000 ng/ μ L. Con ayuda del High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, 4368813) se preparó una mezcla para la obtención del cDNA [2 μ L de 10X RT Buffer, 0.8 μ L de 25X dNTP Mix 100 mM, 2 μ L de 10X RT Random Primer, 1 μ L de MultiScribe Rt, 1 μ L de RNase Inhibitor, 3.2 μ L de agua libre de nucleasas y 10 μ L de muestra], siguiendo las condiciones establecidas en el protocolo utilizando un termociclador (ver anexo 1)

5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

De las muestras de cDNA, se realizaron mezclas para el RT-PCR por muestra [2.5 μ L de 10X buffer sin Mg, 0.75 μ L de 50 mM MgCl₂, 10 mM de dNTP's mix, 1.25 μ L de 10 μ M de oligo forward y 1.25 μ L de 10 μ M de oligo reverse, 0.1 μ L de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen, 15966005), 16.62 μ L de agua y 2 μ L de la muestra de cDNA], en este caso se realizaron 2 RT-PCR: uno para la proteína de unión a TATA (TBP) y otra para *ATXN7*. Se llevaron las muestras al termociclador con las condiciones establecidas en el protocolo (ver anexos 2 y 3). Y finalmente se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1%, como anteriormente se describió, y se fotodocumentaron los geles correspondientes.

Los primers usados para el RT-PCR *ATXN7* fueron:

Myc Forward: 5'-ATGGAGCAGAAGCTGATCTCAG-3'

ATXN7 Reverse: 5'-CTTGGAAGTTGATGAGGATGCG-3'

Y los primers usados para el RT-PCR TBP fueron

TBP Fw: 5'-AAAATGGTGTGCACAGGAGC-3'

TBP Rv: 5'-CTGGGTTTGATCATTCTGTAG-3'

5.6 Hibridación *in situ* fluorescente para RNA (RNA-FISH)

Las células en cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con acetona fría al 2% durante 5 minutos y se incubaron durante la noche en etanol al 70% a 4°C. Las células se prehibridaron en formamida al 30% y SSC 2X durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron durante 3 horas en una cámara humidificada a 37°C con buffer de hibridación [2X SSC, formamida al 30 %, BSA al 0.02 %, complejos de vanadil ribonucleósido 2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 66 µg/ml de ARNt de levadura (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), y 0.2 nM de sonda CAG⁽⁶⁾ conjugada con Cy3 (Sonda YCO0070734, Custom LNA Oligonucleotide). Las preparaciones se lavaron en buffer de prehibridación a 45°C durante 30 min, dos veces en 1X SSC a temperatura ambiente, y una vez en PBS. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las células se montaron en portaobjetos con VectaShield que contenía DAPI (Vector Labs Inc, H-1000-10). Por último, las células se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss Image A1) y se capturaron imágenes para su análisis utilizando el Software ZEN Microscopy.

5.7 Inmunofluorescencia

Las células en cubreobjetos se lavaron 3 veces en PBS, se fijaron con 1mL de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en PBS, después se permeabilizaron los cubreobjetos con 1 mL de tritón al 0.2% por 10 minutos, nuevamente se hicieron lavados con PBS y se realizó el bloqueo con 100 µL de gelatina al 0.5% y SFB al 1.5% en PBS por 20 minutos, se realizaron lavados con PBS y se incubaron los anticuerpos primarios específicos para hnRNPL (Abcam, ab1790) en dilución 1:350, SMN (Santacruz, sc-365909) en dilución 1:100, c23 nucleolina (Santacruz, sc-8031) en dilución 1:150, coilina (Santacruz, sc-55594) en dilución 1:500 y fibrilarina (Santacruz, sc-374022) en una dilución 1:100. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche, las preparaciones se lavaron 3 veces en PBS, y se incubaron por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios fluorescente correspondiente. Para SMN, fibrilarina, coilina y nucleolina se usó el anticuerpo

antimouse FITC, de la marca Invitrogen (616511) y para hnRNPL se usó el anticuerpo secundario FITC anti-rabbit IgG de la marca Vector Laboratories (F1-1000); ambos en dilución 1:100 (es decir, 1 μ L de anticuerpo secundario con 99 μ L de BSA al 3% preparada en PBS). Se lavaron los cubreobjetos en PBS 3 veces, posteriormente se lavaron con H₂O MilliQ y, finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI y se montaron en portaobjetos con VectaShield que contenía DAPI (Vector Labs Inc, H-1000-10). Por último, las células se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss Image A1) y se capturaron imágenes para su análisis utilizando el Software ZEN Microscopy.

5.8 RNA-FISH acoplado a inmunofluorescencia

Las células en cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con acetona fría al 2% durante 5 minutos, las células se prehibridaron en formamida al 30% y SSC 2X durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron durante 3 horas en una cámara humidificada a 37°C con buffer de hibridación [2X SSC, formamida al 30 %, BSA al 0.02 %, complejos de vanadil ribonucleósido 2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 66 μ g/ml de ARNt de levadura (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), y 0.2 nM de sonda CAG₍₆₎ conjugada con Cy3 (Sonda YCO0070734, Custom LNA Oligonucleotide). Las preparaciones se lavaron en buffer de prehibridación a 45°C durante 30 min, se lavó en SSC 1X a temperatura ambiente. Tras el último lavado, se permeabilizaron los cubreobjetos con 1 mL de tritón al 0.2% por 10 minutos, se hicieron 3 lavados con PBS y se realizó el bloqueo con 100 μ L de gelatina al 0.5% y SFB al 1.5% en PBS por 20 minutos, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS y se incubaron los anticuerpos primarios y secundarios específicos tal cual se describió en el apartado previo

7. Resultados

Se utilizaron células HeLa que fueron transfectadas transitoriamente, con ayuda de un sistema de expresión de genes inducibles llamado Tet-On 3G. Este sistema consiste en que las células de interés expresen una proteína trans activadora llamada “Tet-On 3G” y el gen de interés bajo el control de un promotor TRE3G (P_{TRE3G}) que expresa altos niveles del gen, solo en presencia de doxiciclina (Dox) (Zhou *et al.*, 2006; Loew *et al.*, 2010; Clontech, 2023). Para las células HeLa se utilizaron los plásmidos pCMV-Tet3G y pTRE3G-Myc-10Q o pTRE3G-Myc-64Q, en la Figura 10 se esquematiza la inducción de la expresión del gen *ATXN7*, que de acuerdo con el sistema TetOn, el transactivador sólo se une al pTRE3G en presencia de Doxiciclina (Dox) encendiendo la expresión.



Figura 10. Representación de la expresión del gen *ATXN7* inducida por Dox
Recuperado de: RNA Foci Formation in a Retinal Glial Model for
Spinocerebellar Ataxia Type 7 (p.6), por Suárez, R., *et al.* (2023), *Life* 2023, 13(23).

En células HeLa se realizaron pasajes celulares, donde posteriormente se sembraron en cubreobjetos en cajas de 6 pozos, tras un día de sembrado se realizaron transfecciones transitorias que duró 24 horas.

Se realizó RNA FISH por triplicado en células HeLa, transfectadas con ataxina portando 10 (10Q) o 64 (64Q) repeticiones de CAG, sembradas en cubreobjetos y tratadas (+Dox) o no tratadas (-Dox) con doxiciclina. La Figura 11 muestra la presencia del RNA mutante solo en las células que expresan el RNA mensajero mutante (HeLa 64 +Dox) en contraste con las células control.

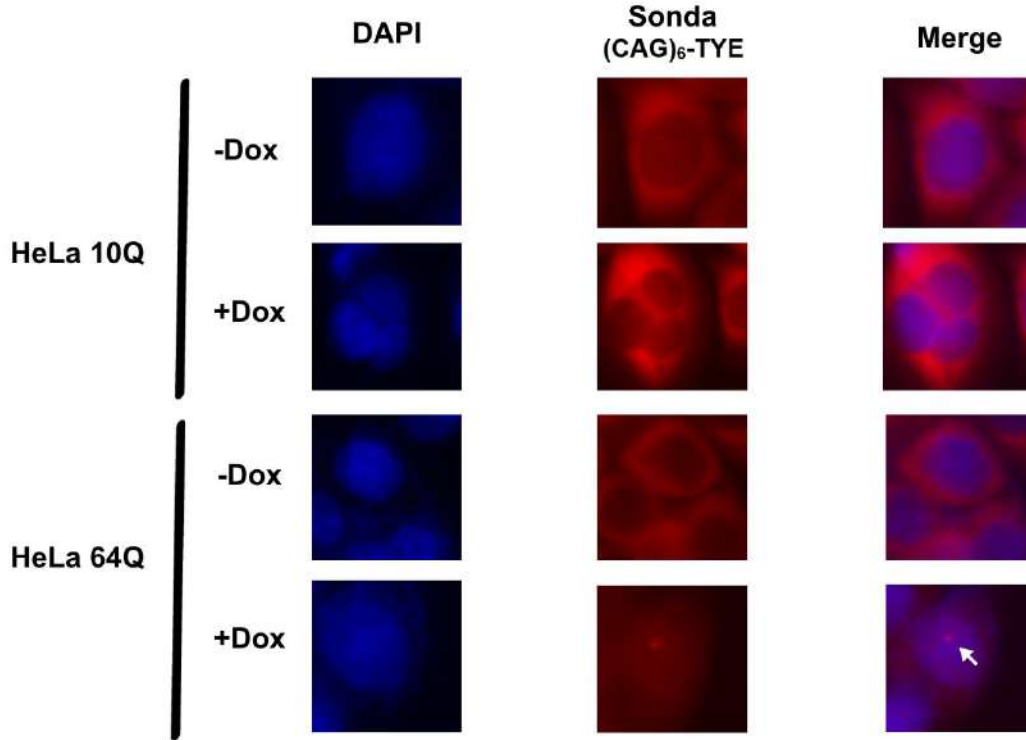


Figura 11. RNA FISH de células HeLa 10Q y 64Q

Nota: La flecha blanca en HeLa 64Q +Dox indica que hay presencia de focos nucleares.

Tras verificar que las células expresaron el RNA mutante, nuevamente por triplicado se sembraron células en cubreobjetos y se transfectaron transitoriamente por 24 horas, posteriormente se procedió a realizar el RNA FISH acoplado a inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios para analizar las proteínas SMN, Nucleolina, Fibrilarina, hnRNPL y Coilina en las células HeLa trasfectadas con los plásmidos control 10Q (Figura 12) y 64Q (Figura 13). De manera interesante, se puede observar que en las células transfectadas con ataxina-7 con 64 repetidos de CAG (64Q), el RNA mensajero mutante co-localiza con las proteínas fibrilarina, SMN y hnRNPL.

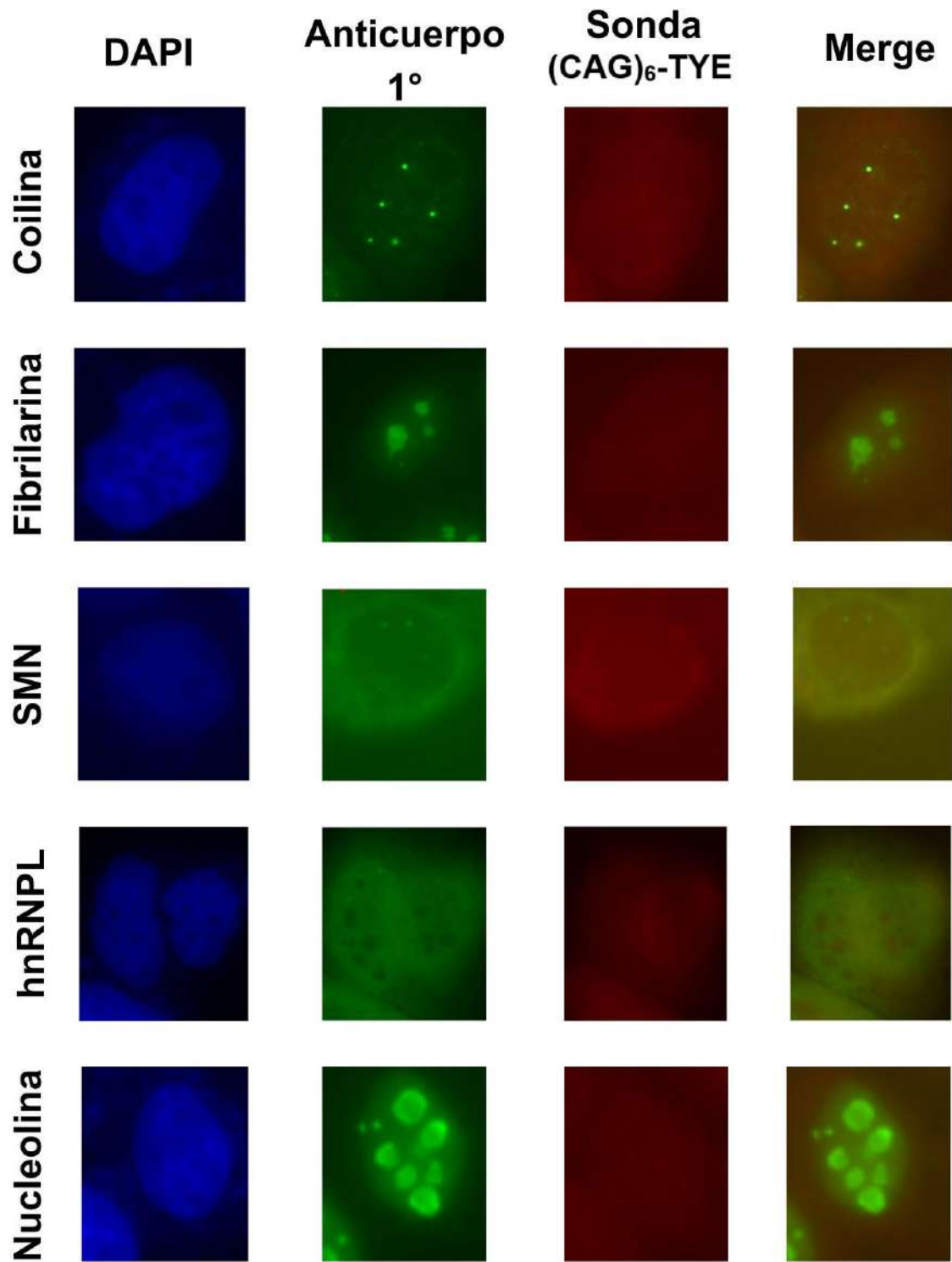


Figura 12. RNA FISH acoplado a Inmunofluorescencia de células HeLa 10Q con los diferentes anticuerpos primarios.

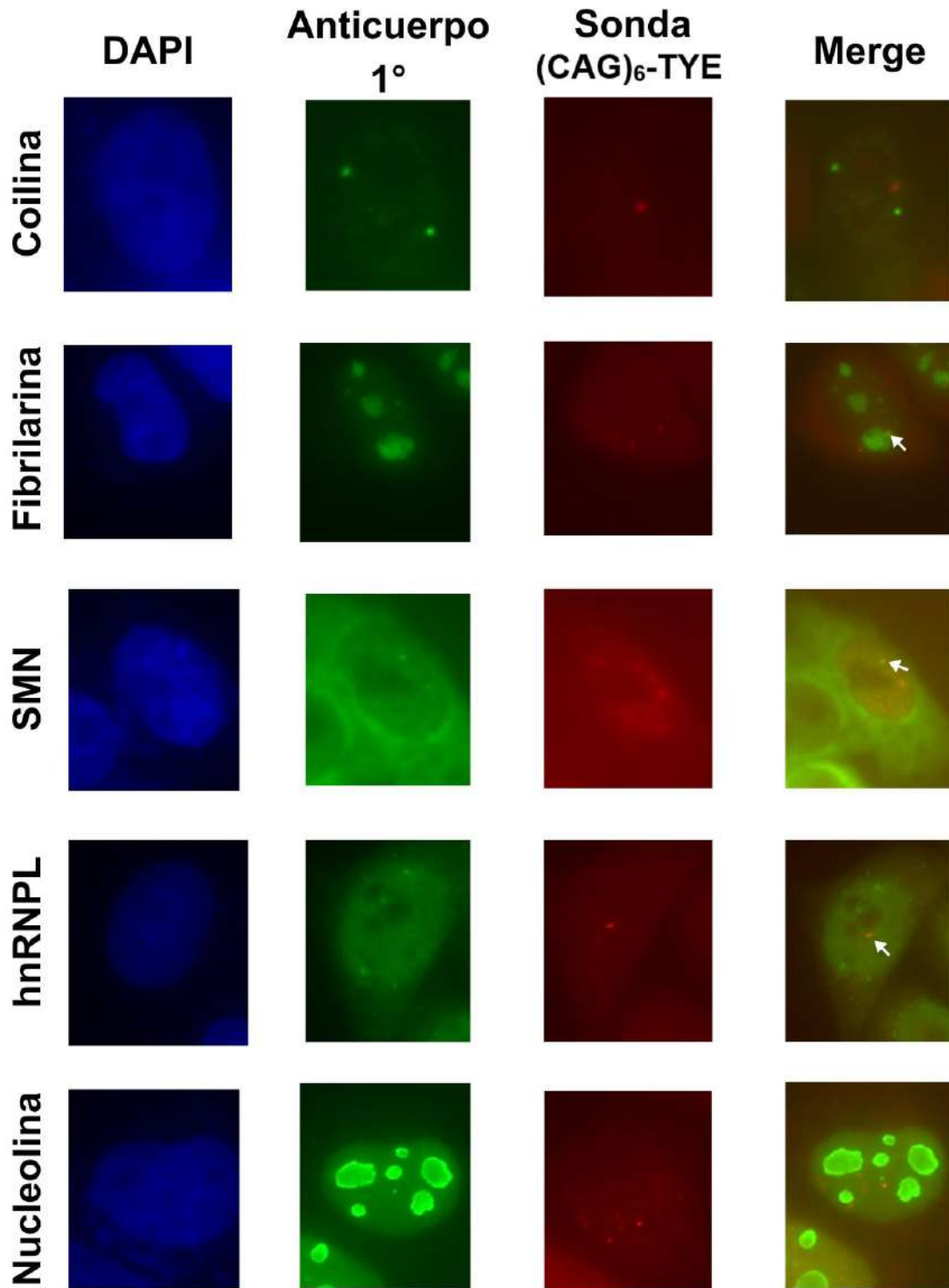


Figura 13. RNA FISH acoplado a Inmunofluorescencia de células HeLa 64Q con los diferentes anticuerpos primarios.

Nota: Las flechas indican que existe una colocalización entre los agregados de RNA y las diferentes regiones celulares: SMN, fibrilarina y hnRNPL; en donde se observó un cambio de color a amarillo.

Una vez establecido que las células HeLa expresaron los focos nucleares y hubo co-localización con fibrilarina, SMN y hnRNPL, se usaron las células gliales MIO-M1 64Q, modelo de estudio de SCA7.

Inicialmente y para confirmar que las células MIO-M1 10Q y MIO-M1 64Q expresaron correctamente el gen *ATXN7* se indujeron durante tres días con (+Dox) o sin (-Dox) doxiciclina (2 µg/mL), y posteriormente se extrajo RNA. En la Tabla 2 se indica la concentración y la pureza de estas muestras ($A_{260/280}$) y en la Figura 14 se muestra la integridad de los RNA extraídos. Como se puede apreciar la pureza e integridad de las muestras fue adecuada.

Tabla 2. Concentración y pureza de RNA

	Concentración (ng/µL)	$A_{260/280}$
-10Q	593.3	1.76
+10Q	917.9	1.73
-64Q	377.9	1.82
+64Q	435.8	1.83

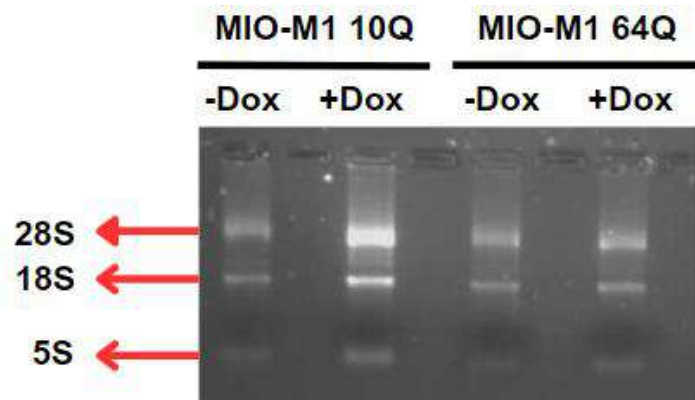


Figura 14. Integridad de RNA

Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA con estas muestras, y se realizaron ensayos de RT PCR para evaluar la expresión del gen housekeeping *TBP* (Tata binding protein) y del transgén *ATXN7* (Figura 15). Como se observa en la Figura 15, tanto las células control (MIO-M1 10Q) y las células mutantes (MIO-M1 64Q)

expresan el transcrito de ATXN7 cuando los cultivos se tratan con doxiciplina (+Dox) pero no en ausencia de esta (-Dox), confirmando la efectividad del sistema de expresión. Por su parte, la detección del transcrito de TBP evidenció la síntesis adecuada de cDNA y la homogeneidad de las muestras.

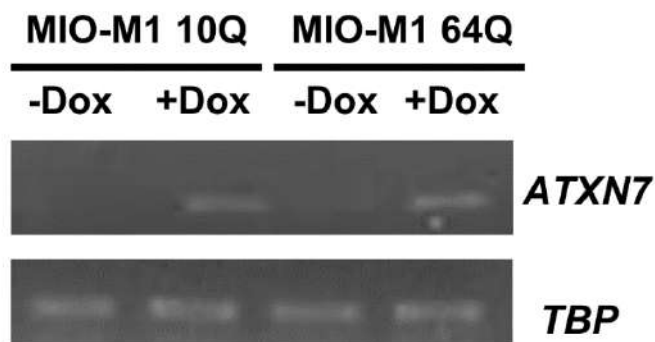


Figura 15. RT-PCR *TBP* y *ATXN7*

Nota: La expresión de *TBP* se utilizó como house-keeping, el tamaño del amplicón es de 245 pb.

Por otro lado, la expresión *ATXN7*, el tamaño del amplicón de MIO M1 10Q es de 702 pb y de MIO M1 64Q es de 865 pb.

Se prosiguió a realizar RNA FISH para comprobar que las células MIO-M1 64Q presentan los focos nucleares del RNA mutante, esto se realizó por triplicado. En la Figura 16 se observa que la presencia de RNA mutante es exclusiva de las células MIO-M1 64Q en presencia de doxiciclina y no en las condiciones control.

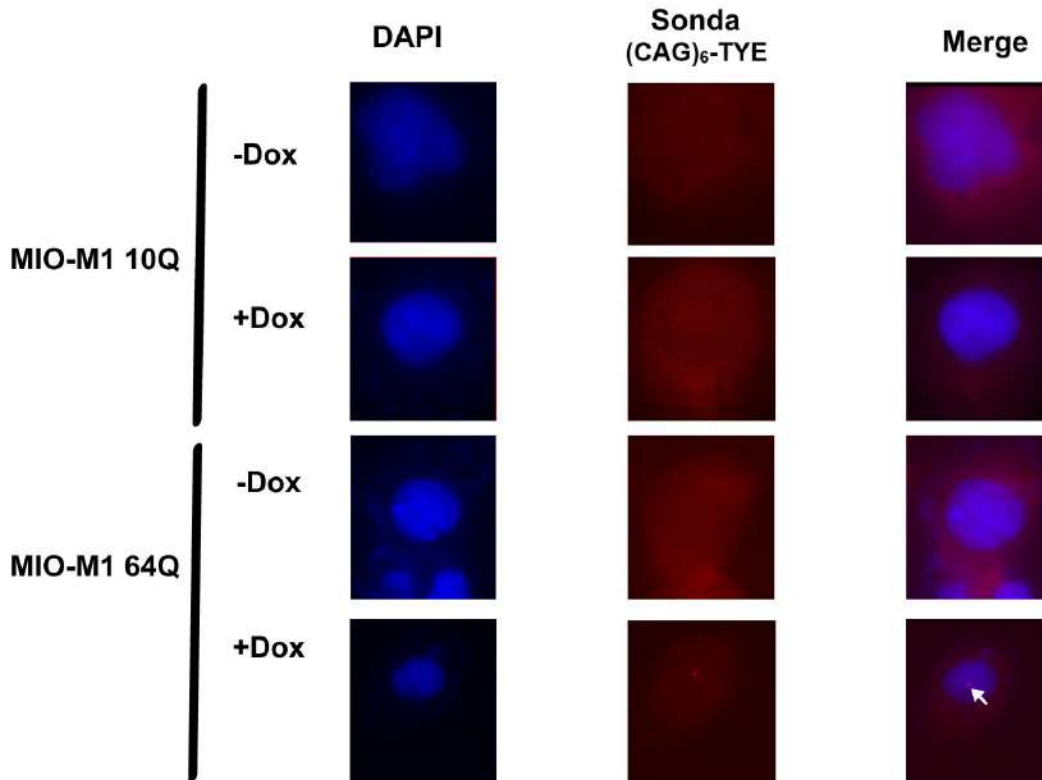


Figura 16. RNA FISH de células MIO-M1 10Q y 64Q

Nota: La flecha blanca en MIO-M1 64Q +Dox indica que hay presencia del RNA mutante en el núcleo.

Una vez que se observaron focos nucleares en las células MIO M1 64Q, se realizó por triplicado RNA FISH acoplado a inmunofluorescencia en células MIO-M1 64Q cultivadas por triplicado en ausencia o presencia de doxiciclina. Como se puede observar en las 17 y 18, existe una co-localización del RNA mutante de ataxina-7 con las proteínas fibrilarina y hnRNPL en las células 64Q inducidas con doxiciclina, pero no en las células no inducidas.

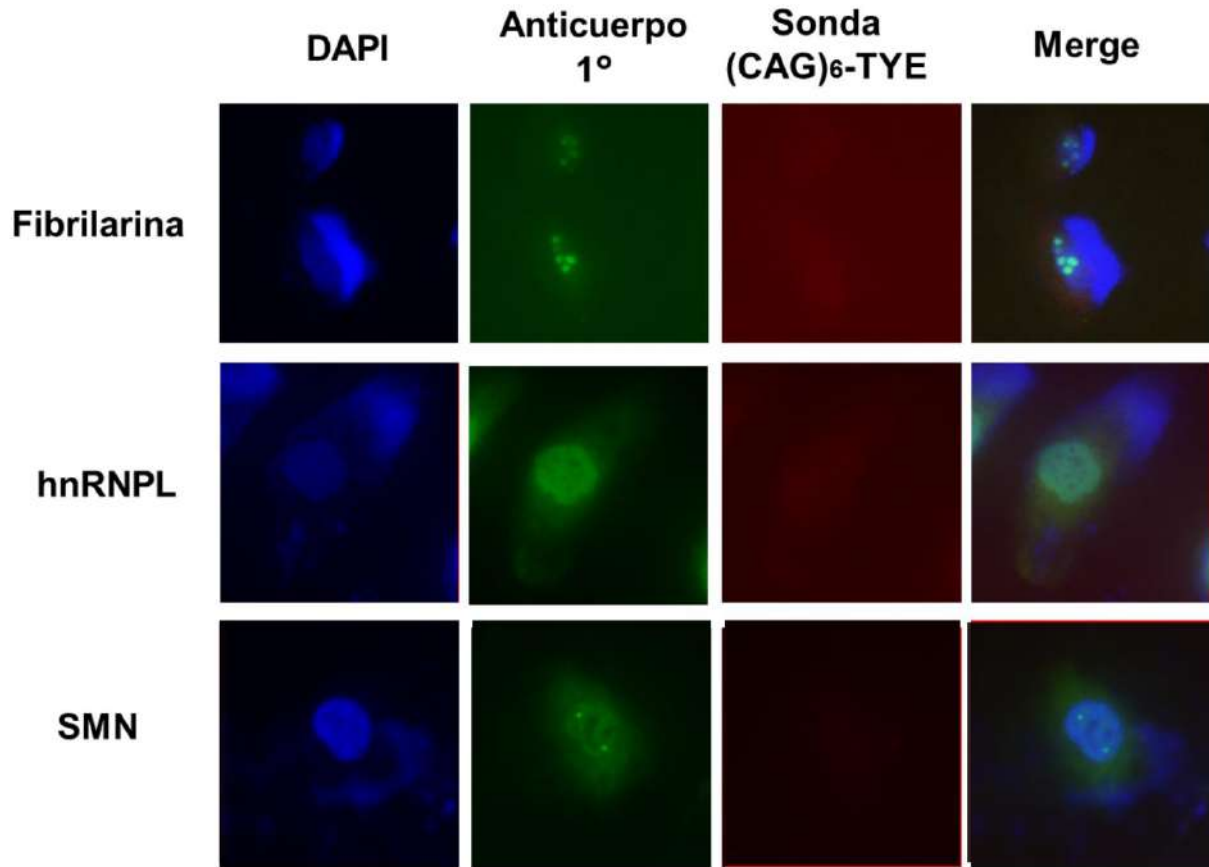


Figura 17. RNA FISH acoplado a Inmunofluorescencia en células MIO M1 64Q sin Dox.

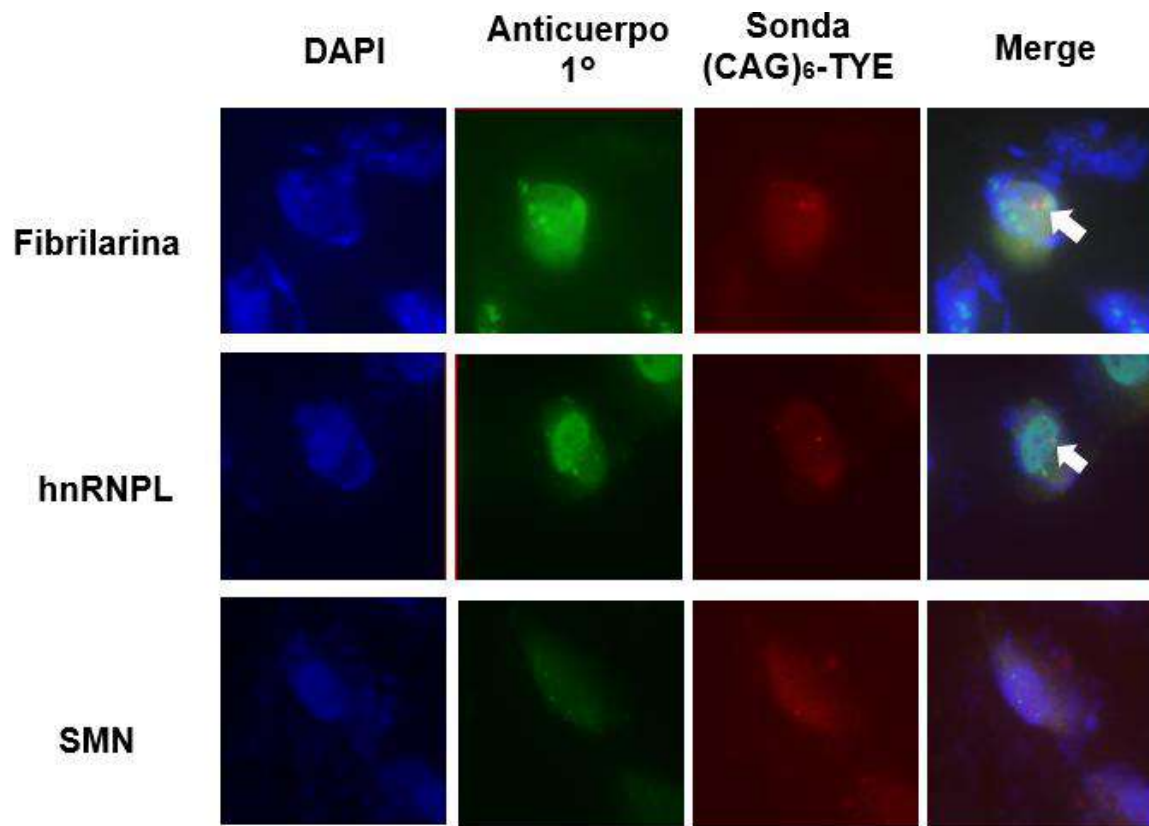


Figura 18. RNA FISH acoplado a Inmunofluorescencia en células MIO M1 64Q con Dox.

Nota: Las flechas indican que existe una colocalización entre los agregados de RNA y las diferentes regiones celulares entre fibrilarina y hnRNPL.

8. Discusión

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 es una enfermedad poliglutamínica causada por la expansión del trinucleótido CAG en el exón 3 del gen *ATXN7*, dando como resultado la traducción de la proteína ataxina-7 mutante. (Michalik, Martín & Van Broeckhoven, 2004; Martin, 2012). Se ha documentado que en SCA7 hay afectación en cerebelo, específicamente en la capa de células de Purkinje, los núcleos dentados y los núcleos olivares inferiores del cerebelo habiendo una afectación en la glía de Bergmann. Sin embargo, en la retina se desconoce el papel de la ataxina-7 mutante particularmente en las células de la glía de Müller, lo cual tiene importancia dado el vínculo entre la glía y las células fotorreceptoras. En los últimos años se ha podido reconocer que las repeticiones de CAG expandidas también ejercen efectos dañinos a través de un mecanismo de ganancia de función tóxica de RNA. Lo cual se ha demostrado por detección de co-localización del transcrito con algunas proteínas nucleares en forma de inclusiones ribonucleares microscópicas (Wojciechowska & Krzyzosiak, 2011; Karam & Trotter, 2018; Suárez *et al.*, 2023).

Para comprobar que las células expresaran el gen de interés y los focos nucleares, primero se realizaron estandarizaciones con células HeLa transfectadas transitoriamente usando el sistema de expresión de genes inducibles llamado Tet-On 3G (figura 10) con 10 repeticiones de CAG (10Q) y 64 repeticiones de CAG (64Q), este último expresó focos nucleares de RNA mutante (figura 11). Asimismo, para afirmar que había co-localización entre los agregados mutados y los diferentes territorios nucleares se utilizó la técnica de RNA FISH acoplado a inmunofluorescencia, de acuerdo con la figura 13 existe una co-localización entre los focos nucleares y SMN, Fibrilarina y hnRNPL. Sin embargo, en fibrilarina se observó una co-localización parcial, en comparación con hnRNPL y SMN.

Por otro lado, se usaron células gliales estables, MIO-M1 10Q y 64Q, inducidas y no inducidas, en donde se determinó la expresión del transgén (Tabla 2 y Figura 14). Se observó que hay integridad de los RNA extraídos, de acuerdo con Díaz *et al.* (2013), el estudio de integridad por electroforesis es el complemento al análisis

de cantidad y calidad del RNA, que es necesario para llevar a cabo los RT-PCRs de manera exitosa. Además, según Michel y colaboradores (2018), en la figura 14, se puede observar la representación de las bandas características de las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal, con lo cual se confirma la purificación del RNA de manera correcta.

Posterior a la extracción de RNA se sintetizó cDNA para analizar la expresión del gen *ATXN7* por medio de una RT-PCR. En el estudio de Suárez y colaboradores (2022), se analizó la expresión del mRNA de ataxina-7 exógeno mediante RT-PCR utilizando cebador directo específico del epítipo c-myc, en donde detectaron transcripciones de ataxina-7 en células MIO-M1 10Q y MIO-M1 64Q, después de la inducción con doxiciclina (3 días), por otro lado, los mRNA de ataxina-7 no se detectaron en células MIO-M1 10Q y MIO-M1 64Q cultivadas sin doxiciclina. De acuerdo con la figura 15, en este trabajo se detectó la expresión del gen *ATXN7* en las células MIO M1 10Q y 64Q inducidas tal como se reportó previamente.

Por otro lado, se realizó la RT-PCR de *TBP*, como se observa en la figura 15, *TBP* se usó como un house-keeping. Los genes house-keeping, se reconocen como genes de mantenimiento celular que regulan funciones celulares básicas y ubicuas y, por lo tanto, son candidatos válidos para actuar como controles internos para el análisis de la expresión génica (Turabelidze, Guo & DiPietro, 2010).

Asimismo, de manera normal, los transcritos están destinados a transmitir el mensaje de la secuencia de DNA al citoplasma para la expresión de proteínas, las repeticiones alargadas del transcrito mutante son reconocidas de manera aberrante por la maquinaria celular y, por lo tanto, captan un exceso de proteínas específicas, lo que resulta en la retención nuclear del RNA. Como se observa en la Figura 16, las células MIO-M1 64Q inducidas con doxiciclina forman focos nucleares, los cuales son retenidos debido a su carga anormal, es decir a la presencia de gran cantidad de moléculas de RNA defectuosos asociados con proteínas que llegan a interactuar de forma no específica con repeticiones expandidas (Wojciechowska & Krzyzosiak, 2011; Martí, 2016).

Una vez que se observaron que las células gliales formaron focos nucleares se procedió a hacer RNA FISH acoplado a inmunofluorescencia, se observa en la figura 17 que las células MIO-M1 64Q no inducidas no expresaron focos nucleares y, por lo tanto, no existe una co-localización entre los focos y los diferentes territorios nucleares. Por el contrario, las células MIO M1 64Q inducidas expresaron focos nucleares. En la figura 18 al usar los anticuerpos primarios hnRNPL, fibrilarina y SMN, se observa que hubo una co-localización entre los focos nucleares con las proteínas hnRNPL y fibrilarina.

La fibrilarina es una proteína nucleolar altamente conservada que se localiza preferentemente en el DFC del nucléolo, que está asociada con todos los RNA nucleolares pequeños de Box C/D y funciona en el procesamiento temprano y la modificación del precursor de rRNA (pre-rRNA) (Mohammed *et al.*, 2007; Shubina *et al.*, 2020).

En un estudio de SCA3, de acuerdo con Tsoi y colaboradores (2012) se demostró que los mRNA mutantes que portan repeticiones CAG expandidas se ubican conjuntamente con fibrilarina, así sugiriendo que los RNA mutantes interfieren con la función nucleolar, desregulando la biogénesis de ribosomas. En este mismo estudio, se observó una regulación negativa del nivel de pre-RNA (anterior a la formación de la subunidad 45s) en moscas transgénicas con 78 repeticiones de CAG en comparación con moscas control con 27 repeticiones de CAG.

La RNA polimerasa I es responsable de la transcripción de los pre-rRNA, se ha demostrado que la inhibición de esta transcripción causa apoptosis en las neuronas, en donde se eleva el nivel de proteína p53 y desencadena la apoptosis por medio del estrés nucleolar de la proteína ribosomal-MDM2-p53 (Chan, 2014).

Cuando las moscas transgénicas tienen 78 repeticiones de CAG hay una intensa interacción física entre las proteínas ribosómicas (RpL5, RpL11 y RpL23) y la ubiquitina ligasa E3 MDM2, una función celular de MDM2 es mediar en la degradación de p53, esta última proteína se encontró un nivel elevado de proteína p53 celular y estaba enriquecida en la fracción mitocondrial de estas células expandidas que expresan CAG en el RNA (Tsoi *et al.*, 2012; Lafita & Conacci, 2023).

La acumulación de p53 altera las interacciones entre las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (familia de moléculas reguladoras de la apoptosis) (Vaseva & Moll, 2009). En condiciones sin estrés, la proteína antiapoptótica Bcl-xL interactúa con la proteína proapoptótica Bak, esta interacción previene la oligomerización de Bak. Asimismo, cuando p53 se acumula en las mitocondrias interactúa con Bcl-xL y permite que Bak se oligomerice en la membrana externa mitocondrial para formar poros para realizar la liberación de citocromo c de las mitocondrias promoviendo así la apoptosis (Mihara *et al.*, 2003).

Bajo condiciones normales el citocromo c se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial, sin embargo, algunos estímulos provocan la liberación de citocromo c al citosol, lo que se acompaña de pérdida del potencial de membrana y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 y una vez unido recluta y activa a la caspasa 9, la cual puede a su vez activar otras caspasas como la caspasa 3 (García, 2003).

Por otro lado, según Hung y colaboradores (2008), la ribonucleoproteína nuclear heterogénea tipo L (hnRNPL) es una proteína de unión al RNA que se encuentra enriquecida en el núcleo, siendo éste un regulador postranscripcional del empalme de los mRNA, además, exporta mRNA de genes sin intrones y da estabilidad a estos, por otro lado, regula la traducción mediada por el sitio de entrada del ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés).

En la figura 13 y 18 se observa que existe una co-localización entre agregados o focos nucleares con hnRNPL, como se comentó anteriormente en SCA7 las repeticiones de CAG expandidas ocurren dentro de los focos nucleares de RNA y hnRNPL tiene una mayor afinidad a unirse a elementos de RNA ricos en citocina/adenina (CA) (Hui *et al.*, 2005; Urbanek *et al.*, 2016).

Varios estudios han comprobado que hnRNPL estimula la traducción del mRNA de p53, es decir, podría actuar como un espliceosoma alternativo y como RBP clásico a la región 5' no traducida (UTR) del mRNA de p53, además, hnRNPL actúa como un factor de empalme de intrones que interactúa con repeticiones de CA en la región UTR 3' en el mRNA de Bcl-2. Al disminuir hnRNPL conduce a la degradación del

ARN de Bcl-2 e induce la apoptosis (Seo *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2019; Gu., *et al.*, 2020). Al silenciar hnRNPL en células CRC (de cáncer colon-rectal) hubo un incremento en la apoptosis, ya que hay una disminución de la expresión de las proteínas Bcl-2, por lo tanto, aumentó la expresión de la proteína Bax la cual se acumula en la membrana externa mitocondrial, se oligomeriza y media la permeabilización de la membrana externa mitocondrial conduciendo a la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c. De manera interesante, se encontró que el silenciamiento de hnRNPL se escinde y se activa la caspasa-3. La caspasa-3 es una caspasa ejecutora que es activada por las caspasas iniciadoras y son las responsables de la interacción con otras moléculas que desencadenan la apoptosis (García, 2003; Peña & García, 2018; Zhao, Wang & Wang, 2021).

Por lo que probablemente hnRNPL se une a los mRNA mutantes con tripletes de CAG de SCA7 y esta proteína deja de fungir su papel como factor de empalme de intrones del mRNA de Bcl-2, por lo tanto, se reducen los niveles de Bcl-2 y se puede desencadenar la apoptosis.

9. Conclusión

En las células MIO-M1 64Q, se forman focos nucleares de RNA mutante, los cuales están asociados con las proteínas hnRNPL y fibrilarina en el nucleolo. Debido a la función de ambas proteínas es posible proponer la hipótesis de desregulación en la biogénesis ribosomal, alteración de splicing alternativo y estrés nucleolar, lo cual eventualmente promovería apoptosis en presencia del RNA mensajero mutante de SCA7.

Referencias

- Aquino, C. (2016). Análisis de la localización y dinámica de la fibrilarina. [Tesis de maestro en ciencias]. Centro de Investigación Científica de Yucatán. https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1135/1/PCB_BB_M_M_Tesis_2016_Aquino_Cecilia.pdf
- Bonnet, J., *et al.* (2010). The structural plasticity of SCA7 domains defines their differential nucleosome-binding properties. *EMBO Rep*, 11(8), pp. 612-618. doi:10.1038/embor.2010.98.
- Chan H. Y. (2014). RNA-mediated pathogenic mechanisms in polyglutamine diseases and amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(431). doi: 10.3389/fncel.2014.00431.
- Clontech. (2023). *Tet-On® 3G Inducible Expression Systems User Manual* (Last edition). https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/Tet/Tet-On%203G%20Inducible%20Expression%20System%20User%20Manual%20%28PT5148-1%29_010814.pdf
- David, G., *et al.* (1998). Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Human molecular genetics*, 7(2), pp. 165–170. doi: 10.1093/hmg/7.2.165.
- Díaz, C., *et al.* (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(3), pp. 298-303.
- Dubois, M. & Boisvert, F. (2016). The Nucleolus: Structure and Function. *The Functional Nucleus*, 23, pp. 29–49. doi: 10.1007/978-3-319-38882-3_2.
- Dueñas, A., *et al.* (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, 129(6), pp. 1357–1370. doi:10.1093/brain/awl081
- Dundr, M. & Misteli, T. (2010). Biogenesis of nuclear bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12), a000711. doi: 10.1101/cshperspect.a000711

- Faber, G., *et al.* (2022). Nuclear speckle—a driving force in gene expression. *Journal of Cell Science*, 135(13). doi: 10.1242/jcs.259594.
- Geuens, T., Bouhy, D. & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet* 135, pp. 851–867. doi: 10.1007/s00439-016-1683-5.
- Giller, D., *et al.* (1997). Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet*, 17(1), pp. 65-70. doi:10.1038/ng0997-65.
- Giller, D., *et al.* (1998). Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Hum Mol Genet*, 7(2), pp. 165-70. doi:10.1093/hmg/7.2.165.
- Giunti, P., *et al.* (1999). Molecular and clinical study of 18 families with ADCA type II: evidence for genetic heterogeneity and de novo mutation. *Am J Hum Genet*, 64(6), pp. 1594-1603. doi: 10.1086/302406.
- Goldman, D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 15(7), pp. 431-42. doi: 10.1038/nrn3723.
- Gómez, A., *et al.* (2017). Voice Alterations in Patients With Spinocerebellar Ataxia Type 7 (SCA7): Clinical-Genetic Correlations. *Journal of Voice*, 31 (1), pp. 123.e1-123.e5. doi: 10.1016/j.jvoice.2016.01.010.
- Goswami, R., *et al.* (2022). The Molecular Basis of Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 818757. doi: 10.3389/fnins.2022.818757.
- Gu, J., *et al.* (2020). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPL) in cancer. *Clinica chimica acta; International journal of clinical chemistry*, vol. 507, pp. 286–294. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.040.
- Hebert, M., *et al.* (2001). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev*, 15(20), pp. 2720-2729. doi: 10.1101/gad.908401.

- Hsu, R., *et al.* (2011) Long tract of untranslated CAG repeats is deleterious in transgenic mice. *PLoS One*, 6(1), e16417. doi: 10.1371/journal.pone.0016417.
- Huang, Y., *et al.* (2021). The MTNR1A mRNA is stabilized by the cytoplasmic hnRNPL in renal tubular cells. *Journal of cellular physiology*, 236(3), pp. 2023–2035. doi:10.1002/jcp.29988
- Hui, J., *et al.* (2005). Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *The EMBO journal*, 24(11), pp. 1988–1998. doi: 10.1038/sj.emboj.7600677
- Hung, L., *et al.* (2008). Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: a combined microarray and RNAi analysis. *RNA*, 14(2), pp. 284–296. doi:10.1261/rna.725208.
- Ilık, I. & Aktas, T. (2022). Nuclear speckles: dynamic hubs of gene expression regulation. *The FEBS Journal*, 289, pp. 7234–7245. doi:10.1111/febs.16117
- Jain, A. & Vale, R. (2017). RNA phase transitions in repeat expansion disorders. *Nature* 546, pp. 243–24. doi:10.1038/nature22386
- Karam, A. & Trottier, Y. (2018). Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Adv Exp Med Biol*, 1049, 197-218, doi:10.1007/978-3-319-71779-1_9.
- Klockgether, T., Mariotti, C. & Paulson, H. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers* 5, 24. doi: 10.1038/s41572-019-0074-3
- La Spada, A. & Taylor, P. (2010). Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 11, 247-258. doi:10.1038/nrg2748.
- Lafarga, M., *et al.* (2017). Cajal bodies in neurons. *RNA biology*, 14(6), pp. 712. doi: 10.1080/15476286.2016.1231360.

- Lafita, M. & Conacci, M. (2023). Nucleolar stress: From development to cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 136, pp. 64–74. doi: 10.1016/j.semcdb.2022.04.001
- Lamond, I. & Spector, L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(8), pp. 605–612. doi:10.1038/nrm1172.
- Lawrence, M., *et al.* (2007). MIO-M1 Cells and Similar Müller Glial Cell Lines Derived from Adult Human Retina Exhibit Neural Stem Cell Characteristics. *Stem Cells*, 25(8), pp. 2033–2043. doi: 10.1634/stemcells.2006-0724.
- Lebre, A. & Brice, A. (2003). Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). *Cytogenet Genome Res* 100, pp. 154–163. doi: 10.1159/000072850.
- Li, L., *et al.* (2008). RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, 453(7198), pp. 1107-1111. doi:10.1038/nature06909.
- Limb, G., *et al.* (2002). In Vitro Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Müller Cell Line (MIO-M1). *IOVS*, 43(3), pp. 864-869. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2200145>
- Lin, X., *et al.* (2000). Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nature neuroscience*, 3(2), pp. 157–163. doi: 10.1038/72101
- Loew, R., *et al.* (2010) Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnol*, 10, 81. doi: 10.1186/1472-6750-10-81.
- Love, J., *et al.* (2017). Cajal bodies and their role in plant stress and disease responses. *RNA Biol*, 14(6), pp. 779-790. doi: 10.1080/15476286.2016.1243650.
- Luo, X., *et al.* (2019). HnRNPL promotes Wilms tumor progression by regulating the p53 and Bcl2 pathways. *OncoTargets and therapy*, 12, pp. 4269–4279. doi: 10.2147/OTT.S203046.

- Magaña, J., *et al.* (2013). Origin of the spinocerebellar ataxia type 7 gene mutation in Mexican population. *Cerebellum*, 12(6), pp. 902-905. doi:10.1007/s12311-013-0505-8.
- Magaña, J., *et al.* (2014). Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clin Genet*, 85(2), pp. 159-165. doi:10.1111/cge.12114.
- Martí, E. (2016). RNA toxicity induced by expanded CAG repeats in Huntington's disease. *Brain Pathol*, 26(6), pp. 779-786. doi:10.1111/bpa.12427.
- Martin, J. (2012). Chapter 30 - Spinocerebellar ataxia type 7. En H, Sankara y A. Subramony (Eds), *Handbook of Clinical Neurology Ataxic Disorders*, pp 475–491, Elsevier. doi:10.1016/b978-0-444-51892-7.00030-9.
- Martínez, S., *et al.* (2019). Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa. *Cells*, 8(5), 421. doi: 10.3390/cells8050421.
- Michalik, A., Martin, J. & Van Broeckhoven, C. (2004). Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet* 12, pp. 2–15. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201108.
- Michel, C., *et al.* (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(6), pp. 1259-1267. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v9n6/2007-0934-remexca-9-06-1259.pdf>
- Mihara, M., *et al.* (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, pp. 577–590. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00050-9.
- Mohammed, A., *et al.* (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360 (2), pp. 320-326. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.092.

- Mohan, R., *et al.* (2014). Loss of *Drosophila* Ataxin-7, a SAGA subunit, reduces H2B ubiquitination and leads to neural and retinal degeneration. *Genes & Development*, vol. 28(3), pp. 259–272. doi: 10.1101/gad.225151.113.
- Mongelard, F. & Bouvet, P. (2007). Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends in cell biology*, 17(2), pp. 80–86. doi: 10.1016/j.tcb.2006.11.010.
- Morris, G. (2008). The Cajal body. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, pp. 2108–2115. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.016.
- Motta, L., Heyd, F., & Lynch, K. (2010). Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP L. *Molecular cell*, 37(2), pp. 223–234. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.027.
- Niewiadomska, A. & Trottier, Y. (2019). Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Neurotherapeutics*, 16, pp. 1074–1096. doi: 10.1016/j.neurother.2019.06.002.
- Palhan, B., *et al.* (2005). Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (24), pp. 8472–8477. doi:10.1073/pnas.0503505102.
- Peña, A. & García, A. (2018). Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal*, 285(3), 416–431. doi: 10.1111/febs.14186.
- Popova, E. & Barnstable, C. (2019). Insights Into the Epigenetics of Retinal Development and Diseases. *Epigenetics and Regeneration*, 11, pp. 355–383. doi:10.1016/b978-0-12-814879-2.00016-9.
- Seo, J., *et al.* (2017). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) L promotes DNA damage-induced cell apoptosis by enhancing the translation of p53. *Oncotarget*, 8(31), pp. 51108–51122. doi: 10.18632/oncotarget.17003.
- Shao, J. & Diamond, I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet*, 16(2), pp. 115–123. doi:10.1093/hmg/ddm213.

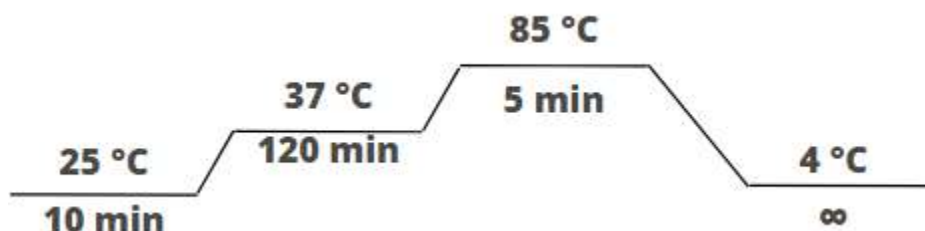
- Shubina, M., *et al.* (2020). The GAR domain integrates functions that are necessary for the proper localization of fibrillarin (FBL) inside eukaryotic cells. *PeerJ*, 8, e9029. doi: 10.7717/peerj.9029.
- Sicot, G. & Gomes, M. (2013). RNA toxicity in human disease and animal models: from the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies. *Biochim Biophys Acta*, 1832(9), pp. 1390-1409. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.002.
- Soong, W., & Morrison, J. (2018). Spinocerebellar ataxias. *Handbook of Clinical Neurology*, 155, pp. 143–174. doi:10.1016/b978-0-444-64189-2.00010-x.
- Stępiński, D. (2020). Cajal body dynamics in soybean root meristem cells under chilling stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104241. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104241.
- Stevanin, G., *et al.* (1999). Multiple origins of the spinocerebellar ataxia 7 (SCA7) mutation revealed by linkage disequilibrium studies with closely flanking markers, including an intragenic polymorphism (G3145TG/A3145TG). *Eur J Hum Genet*, 7(8), pp. 889-96. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200392.
- Suárez, R., *et al.* (2023). RNA Foci Formation in a Retinal Glial Model for Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(1), 23. doi: 10.3390/life13010023.
- Sullivan, R., *et al.* (2019). Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol*, 266(2), pp. 533-544. doi: 10.1007/s00415-018-9076-4.
- Tercero, K., *et al.* (2019). Effects of Physical Rehabilitation in Patients with Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Cerebellum*, 18(3), pp. 397-405, doi:10.1007/s12311-019-1006-1.
- Trottier, Y., *et al.* (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 378:403–406.

- Tsoi, H., & Chan, H. (2014). Roles of the nucleolus in the CAG RNA-mediated toxicity. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(6), pp. 779–784. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.11.015.
- Tsoi, H., et al. (2012). CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), pp. 13428–13433. doi: 10.1073/pnas.1204089109
- Turabelidze, A., Guo, S., & DiPietro, L. (2010). Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 18(5), pp. 460–466. doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x.
- Urbanek, M. & Krzyzosiak, J. (2016). RNA FISH for detecting expanded repeats in human diseases. *Methods* 98, 115-123. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.11.017.
- Urbanek, M., et al. (2016). Nuclear speckles are detention centers for transcripts containing expanded CAG repeats. *Biochim Biophys Acta*, 1862(9), pp. 1513-1520. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.05.015.
- van de Warrenburg, P., et al. (2001) Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. *J Neurol*, 248(10), pp. 911-914. doi:10.1007/s004150170082.
- Vaseva, A. & Moll, U. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(5), pp. 414–420. doi: 10.1016/j.bbabbio.2008.10.005.
- Velázquez, L. et al. (2015). A comprehensive clinical and genetic study of a large Mexican population with spinocerebellar ataxia type 7. *Neurogenetics*, 16(1), pp. 11-21. doi:10.1007/s10048-014-0424-y
- Wang, L., et al. (2011). Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Life Sci* 68, pp. 1255-1267. doi:10.1007/s00018-010-0522-4

- Wojciechowska, M, & Krzyzosiak, J. (2011). Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci. *Human molecular genetics*, 20(19), pp. 3811–3821. doi: 10.1093/hmg/ddr299
- Worth, P., *et al.* (2000). Large, expanded repeats in SCA8 are not confined to patients with cerebellar ataxia. *Nature genetics*, 24(3), pp. 214–215. doi: 10.1038/73411
- Yabe, I., *et al.* (2001). Clinical trial of acetazolamide in SCA6, with assessment using the Ataxia Rating Scale and body stabilometry. *Acta neurologica Scandinavica*, 104(1), pp. 44–47. doi: 10.1034/j.1600-0404.2001.00299.x
- Yang, H., *et al.* (2015). Aggregation of Polyglutamine-expanded Ataxin 7 Protein Specifically Sequesters Ubiquitin-specific Protease 22 and Deteriorates Its Deubiquitinating Function in the Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase (SAGA) Complex. *J Biol Chem*, 290(36), pp. 21996-22004. doi:10.1074/jbc.M114.631663.
- Zhao, Y., Wang, Y., & Wang, Q. (2021). HNRNPL affects the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by regulating PD-L1. *Pathology-Research and Practice*, 218, 153320. doi: 10.1016/j.prp.2020.153320.
- Zhou, X., *et al.* (2006) Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Ther*, 13(19), pp. 1382–1390. doi: 10.1038/sj.gt.3302780.

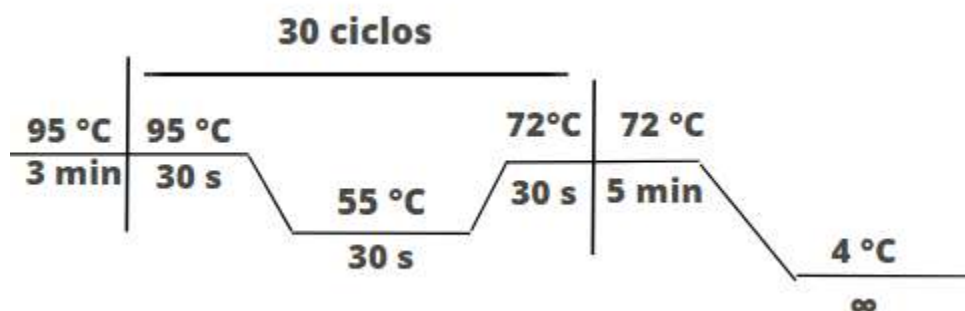
Anexos

Para la obtención del cDNA, se establecieron las siguientes condiciones para la optimización del High-capacity cDNA reverse transcription kit:

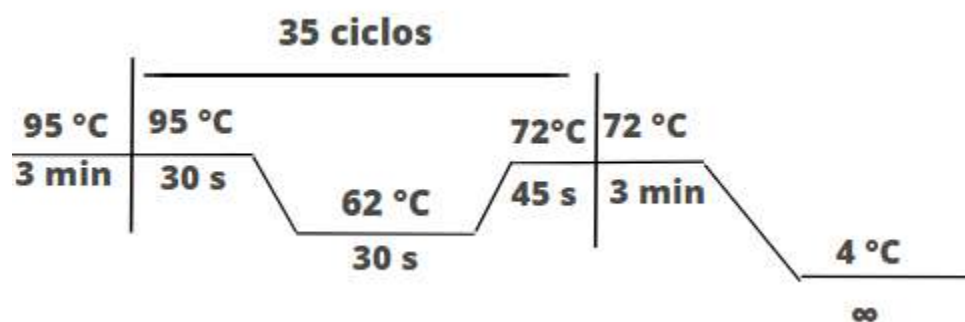


Anexo 1. Condiciones establecidas para el termociclador del cDNA

A continuación, se muestran las condiciones que deben llevar los termocicladores para los RT-PCR empleados, en este caso TBP y ATXN7:



Anexo 2. Condiciones establecidas para el termociclador del RT-PCR TBP



Anexo 3. Condiciones establecidas para el termociclador del RT-PCR ATXN7