



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Proyecto de investigación:

Análisis molecular de Ataxias Espinocerebelosas (SCA3, SCA7 Y SCA17) mediante análisis de fragmentos de tripletes repetidos en población mexicana

Asesores:

Dr. Aurelio Jara Prado

Dr. Francisco Miranda Hernández

Alumna:

Verónica Ariana Morales Cruz

Carrera:

Química Farmacéutica Biológica

Matrícula:

2173062687

Fecha de inicio: 15 de julio de 2022

Fecha de término: 15 enero 2023

Índice

1	Resumen.....	4
2	Introducción	4
3	Objetivo general.....	5
4	Objetivos específicos.....	5
5	Planteamiento del problema	5
6	Justificación.....	6
7	Hipótesis.....	7
8	Marco teórico.....	7
8.1	Ataxia.....	7
8.2	Ataxia espinocerebelosa (SCA).....	7
8.3	Prevalencia de las SCA's.....	8
8.4	Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3)	11
8.4.1	SCA3 y la proteína del gen <i>ATXN3</i>	11
8.5	Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7)	11
8.5.1	SCA7 y la proteína del gen <i>ATXN7</i>	12
8.6	Ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17)	12
8.7	Técnicas moleculares para el análisis de Ácido Desoxirribonucleico (ADN)	13
8.7.1	Cuantificación de ADN.....	13
8.7.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) "Punto Final"	13
8.7.3	Principio de la PCR.....	13
8.7.4	Microsatélites.....	13
8.7.5	Análisis de fragmentos de ADN por medio de electroforesis capilar.....	15
9	Materiales y Métodos	16
10	Desarrollo experimental.....	17
10.1	Cuantificación de ADN.....	17
10.2	Técnica de PCR	18
10.3	Electroforesis capilar	19
11	Resultados y Análisis de Resultados.....	19
11.1	Casos con diagnóstico de SCA3	19
11.2	Casos con diagnóstico de SCA7	20
11.3	Casos con diagnóstico de SCA17	21
12	Discusión	22
13	Conclusión.....	23

14	Perspectivas del presente estudio	24
15	Referencias.....	25

Análisis molecular de Ataxias Espinocerebelosas (SCA3, SCA7 Y SCA17) mediante análisis de fragmentos de triplete repetidos en población mexicana

1 Resumen

Las ataxias espinocerebelosas (SCA's) son un grupo heterogéneo de ataxias cerebelosas hereditarias que se transmiten de forma autosómica dominante. El inicio de la enfermedad se presenta principalmente a mediados de la edad adulta, pero también puede ocurrir en la niñez y en la vejez. Las formas más frecuentes de las SCA's, se deben a expansiones repetidas de trinucleótidos CAG en genes que conducen a la elongación por estiramiento de poliglutamina en sus respectivas proteínas. La prevalencia de SCA de manera global tiene un índice de 3 en 100 000 habitantes, siendo SCA3 el subtipo más común a nivel mundial. En el presente trabajo se determinó el diagnóstico de un grupo de pacientes con Ataxia espinocerebelosa utilizando la técnica de PCR, seguido de una electroforesis capilar para el análisis de fragmentos. Se obtuvo que en un grupo de estudio que involucró a 30 pacientes se encontró que el 10% pertenecen al subtipo SCA3. En otro grupo se analizaron a 102 pacientes para determinar si alguno presentaba el subtipo SCA7, y finalmente, en otro grupo se estudiaron 101 pacientes para el diagnóstico de SCA17, los resultados mostraron que tanto el grupo de SCA7 como de SCA17 no se obtuvieron expandidos. Es necesario que para los pacientes en los que no se obtuvo un diagnóstico de los subtipos de las SCA's analizadas, se les realice el diagnóstico molecular para detectar otros de los subtipos de SCA's, y así poder darle a cada paciente un diagnóstico certero. Así mismo, este estudio aportó información sobre la frecuencia de las SCA's tipo 3, 7 y 17 en población mexicana, siendo SCA3 la más frecuente y SCA7 y SCA17 menos frecuentes en la población mexicana, estos resultados coinciden con lo reportado en otras poblaciones de diferentes partes del mundo.

2 Introducción

Las ataxias espinocerebelosas son un grupo heterogéneo de ataxias cerebelosas hereditarias que se transmiten de forma autosómica dominante. Las SCA's son enfermedades neurológicas que presentan una alteración de la marcha, incoordinación de las extremidades, disartria, anomalías del movimiento ocular, y se pueden presentar otros signos como convulsiones, deterioro cognitivo, miocardiopatía, entre otros. Todos estos signos y síntomas se traslapan entre las diferentes SCA's lo que las hace difícil de diagnosticar. El inicio de la enfermedad se presenta principalmente a mediados de la edad adulta, pero también puede ocurrir en la niñez y en la vejez (Coutelier y col., 2017).

Las formas más frecuentes de las SCA's, se deben a expansiones repetidas de trinucleótidos CAG en genes que conducen a la elongación por estiramiento de poliglutamina en sus respectivas proteínas (Coutelier y col., 2017). Hay al menos 12 SCA de expansión repetida y seis de estas enfermedades que son causadas por mutaciones traducidas de expansiones repetidas de CAG, dentro de ellas se encuentran SCA3/enfermedad de Machado-Joseph (SCA3/MJD), SCA7 y SCA17, las cuales codifican tramos de glutamina pura en las respectivas proteínas de la enfermedad. Estas enfermedades se denominan SCA's de poliglutamina (Klockgether y col., 2019).

La prevalencia de SCA de manera global tiene un índice de 3 en 100 000 habitantes (Sullivan y col., 2019). El subtipo SCA3 es más común a nivel mundial, debido a que es más frecuente en Europa occidental, América del Norte, Brasil y China, por lo que se ha estimado que es la causa de la ataxia en el 21% de los pacientes en todo el mundo. Para el caso de SCA7 esta es ligeramente inferior con un 3-5%. Algunas variantes son muy raras, como es el caso de la SCA17, representando del 0 al 1% de las familias con SCA (Alonso, y col. 2007). Su distribución en México no se encuentra bien definida, por lo tanto, el propósito de este estudio es llevar a cabo el diagnóstico molecular para las ataxias espinocerebelosas (SCA3, SCA7 y SCA17) de un grupo de pacientes mexicanos con ataxia espinocerebelosa, mediante análisis de fragmentos de tripletes repetidos de CAG en muestras de ADN seleccionadas de pacientes que padecen un tipo de ataxia espinocerebelosa.

En el presente trabajo se describe el método más utilizado para el diagnóstico de las SCA, en el que se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando un oligonucleótido marcado con fluorescencia flanqueando la región de repetición de trinucleótidos, seguido de una electroforesis capilar (Análisis de fragmentos). Estas técnicas permitieron detectar las expansiones repetidas de microsatélites causantes de las SCA (Alonso, y col., 2007).

3 Objetivo general

Llevar a cabo el diagnóstico molecular para las ataxias espinocerebelosas (SCA3, SCA7 y SCA17) de un grupo de pacientes mexicanos que presentan este padecimiento, mediante el análisis de fragmentos de tripletes repetidos de CAG en muestras de ADN seleccionadas.

4 Objetivos específicos

- Obtener del banco de ADN del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) las muestras correspondientes a pacientes con ataxia espinocerebelosa.
- Realizar diluciones y cuantificar la concentración de ADN que hay en cada una de las muestras seleccionadas del banco de ADN.
- Realizar la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las diluciones de ADN de pacientes y controles negativos y positivos, utilizando un oligonucleótido marcado con fluorescencia.
- Analizar el producto del PCR mediante una electroforesis capilar (análisis de fragmentos), para SCA3, SCA7 y SCA17.
- Identificar los alelos expandidos de cada muestra.
- Determinar frecuencias de las tres diferentes SCA en la muestra de pacientes

5 Planteamiento del problema

Las SCA's son enfermedades neurodegenerativas hereditarias que afectan el cerebro, el cerebelo, el tronco encefálico y los tractos espinocerebelosos. La SCA's tienen diferentes síntomas neurológicos, en los que se incluyen ataxia, disartria, anomalías oculomotoras de origen cerebeloso y supranuclear, retinopatía, atrofia óptica, espasticidad, neuropatía periférica extrapiramidal, trastornos del esfínter, cambios cognitivos y epilepsia. Todos esos signos y síntomas son comunes en las diferentes SCA's lo que complica el diagnóstico específico del tipo de SCA que presenta cada paciente. Durante el desarrollo de la enfermedad las personas pierden la capacidad de caminar con firmeza, así como hablar y

alimentarse. Su prevalencia, en general, se ha determinado que es variable en diferentes regiones. Por lo tanto, su diagnóstico clínico a inicios de la enfermedad es importante para el comienzo del tratamiento adecuado para disminuir su severidad y/o su rápido progreso, sin embargo, esto es un desafío debido a la gran variabilidad fenotípica y genotípica que presenta.

6 Justificación

Las ataxias espino-cerebelosas son un grupo heterogéneo de trastornos atáxicos neurodegenerativos hereditarios que se transmiten de forma autosómica dominante. El inicio de estas enfermedades suele ocurrir en la edad adulta, donde los síntomas aparecen entre la tercera y cuarta década de vida teniendo un progreso lento (Trott & Houenou, 2012); sin embargo, algunas formas pueden presentarse en un inicio juvenil o infantil. Las formas más frecuentes se deben a expansiones repetidas de trinucleótidos citosina-adenina-guanina (CAG) en genes que conducen al aumento en el tracto de poliglutamina, con la subsecuente producción de una proteína tóxica (Coutelier y col., 2017 & Sullivan y col., 2019).

Aunque las mutaciones ocurren con frecuencia en un gen expresado de manera ubicua, la neurodegeneración ocurre en un tipo de célula específico. El mecanismo patogénico por el cual la expansión repetida conduce a la enfermedad incluye una pérdida de función del gen y una ganancia de función por parte del transcrito de ARN mutante o el producto proteico (Perrone & Melone, 2008). Por lo anterior, es de gran interés comprender los mecanismos moleculares de la inestabilidad repetida y el proceso patogénico, con la finalidad de desarrollar un tratamiento eficaz para esta enfermedad.

La prevalencia global de SCA es de 3 en 100 000 habitantes (Sullivan y col., 2019) aunque su distribución en México no se encuentra definida. Hay reportes en poblaciones latinoamericanas que han arrojado que SCA3 es la más frecuente en Brasil, mientras que SCA2 exhibe la mayor incidencia en Cuba y México. En este estudio se establece que en el estado de Veracruz (México), el tipo SCA7 es el que se encuentra con mayor frecuencia. (Magaña, 2013).

Actualmente no existe un tratamiento para retrasar o detener las SCA's, por lo que la atención clínica de los pacientes se enfoca en el manejo de los síntomas a través de la fisioterapia, la terapia ocupacional y la terapia del habla (Klockgether y col., 2019). Debido a la heterogeneidad clínica y genética de las SCA es necesario realizar su identificación mediante la aplicación de técnicas moleculares en ADN genómico, a partir de una muestra sanguínea (Orozco y col., 2017). El método más utilizado para el diagnóstico de las SCA es la PCR utilizando un oligonucleótido marcado con fluorescencia flanqueando la región de repetición de trinucleótidos, seguido de una electroforesis capilar (análisis de fragmentos de ADN). Estas técnicas permiten detectar las expansiones repetidas de microsatélites causantes de las SCA (Alonso, y col., 2007).

Por lo tanto, realizar el diagnóstico diferencial de las SCA's, proporciona información indispensable para determinar las diferencias significativas de los genotipos y fenotipos entre cada SCA, y así poder crear grupos de estudios posteriores para poder generar un tratamiento específico.

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía que se encuentra ubicado en la ciudad de México, se cuenta con un grupo de pacientes que padecen un tipo de SCA desde

1994 que no tienen un diagnóstico molecular determinado sobre el tipo de ataxia que presentan, y debido a que varias de ellas se tienen signos y síntomas similares, por lo que podrían tener un diagnóstico clínico erróneo. Por lo tanto, el análisis de las muestras de ADN de estos pacientes es importante para determinar su diagnóstico, y con base a ello elegir el tratamiento adecuado. Además este estudio proporciona información sobre la distribución de esta mutación en población mexicana.

7 Hipótesis

El uso de técnicas moleculares, PCR y electroforesis capilar, ayudarán a identificar los subtipos de SCA's, presentes en pacientes del INNN, proporcionando datos sobre su frecuencia en México, y con ello se logrará crear grupos de estudios para el desarrollo de nuevos tratamientos específicos para cada una de las SCA's.

8 Marco teórico

8.1 Ataxia

El término ataxia proviene del griego átakos (de a que significa no y tassein que significa ordenar) esto se refiere a la pérdida de armonía del movimiento por asincronía y falta de precisión. En la ataxia los movimientos se caracterizan por ser imprecisos e incontrolados debido a que existe una alteración en la velocidad, la fuerza y duración de estos, afectando la estabilidad de la marcha, el movimiento de los ojos y el habla (Duran & Querol, 2011).

8.2 Ataxia espinocerebelosa (SCA)

Las ataxias espinocerebelosas son un grupo heterogéneo de ataxias cerebelosas hereditarias que se transmiten de forma autosómica dominante. El término espinocerebeloso fue elegido para representar la implicación concomitante de la médula espinal y el cerebelo en estas enfermedades. Sin embargo, la médula espinal no se ve afectada en muchas SCA's y se producen cambios patológicos en otras regiones del sistema nervioso, incluidos los nervios periféricos, el tronco encefálico y los ganglios basales (Klockgether y col., 2019). Las SCA's son enfermedades neurológicas que presentan una alteración de la marcha, incoordinación de las extremidades, disartria, anomalías del movimiento ocular, y se pueden presentar otros signos como convulsiones, deterioro cognitivo, miocardiopatía, entre otros (Coutelier y col., 2017).

El inicio de la enfermedad se presenta principalmente a mediados de la edad adulta, pero también puede ocurrir en la niñez y en la vejez, por lo tanto, esto indica que el rango de inicio de la ataxia cubre casi toda la vida (Klockgether y col., 2019). Actualmente se han identificado más de 40 subtipos, sin embargo, no se ha identificado en todos los casos el gen causante (Martindale, 2017).

Las formas más frecuentes se deben a expansiones repetidas de trinucleótidos CAG en genes que conducen a la elongación por estiramiento de poliglutamina en sus respectivas proteínas (Coutelier y col., 2017). En la Figura 1, se observa el mecanismo de repetición de la expansión de la proteína poliglutamina.

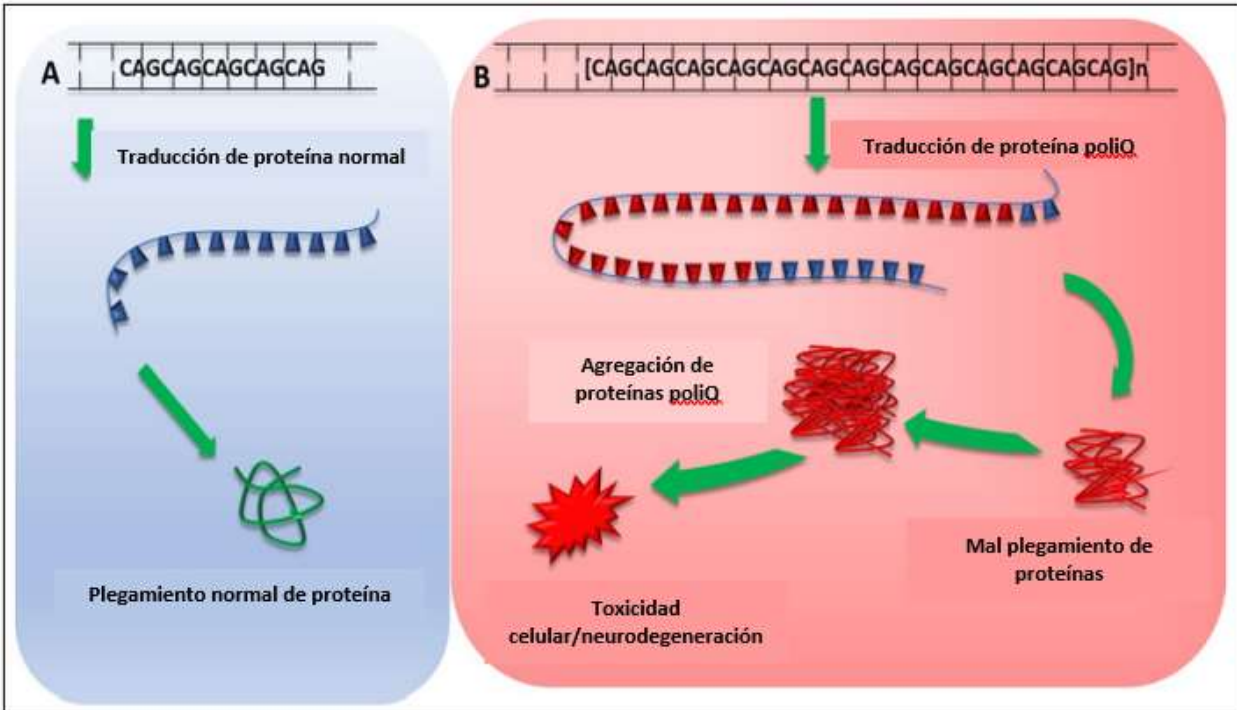


Figura 1. Mecanismo de repetición de la expansión de la proteína poliglutamina. En A se observa una traducción de repetición de poliglutamina dentro del rango normal, produciendo una transcripción y un plegamiento de proteínas normales. En B, hay una longitud de la repetición de expansión de poliglutamina patógena, que conduce a la traducción de la repetición PolyQ anormal expandida, esto produce un plegamiento incorrecto de la proteína y, por lo tanto, las proteínas polyQ mal plegadas forman agregados que generan disfunciones del proceso celular, llevando a la toxicidad celular y a su degeneración (Modificado de Sullivan y col., 2019).

De acuerdo con Klockgether y col., (2019), las SCA se dividen genéticamente en dos grupos principales: las primeras son causadas por mutaciones dinámicas de expansión repetida y las segundas causadas por mutaciones no repetidas. Estas se muestran en la tabla 1.

Hay al menos 12 SCA de expansión repetida y seis de estas enfermedades que son causadas por mutaciones traducidas de expansiones repetidas de CAG, dentro de ellas se encuentran SCA3/enfermedad de Machado-Joseph (SCA3/MJD), SCA7 y SCA17, las cuales codifican tramos de glutamina pura en las respectivas proteínas de la enfermedad. Estas enfermedades se denominan SCA's de poliglutamina (Klockgether y col., 2019).

8.3 Prevalencia de las SCA's

Los datos epidemiológicos de SCA están limitados por los pocos estudios que se han realizado en diferentes regiones geográficas. Debido a ello, no es posible definir la prevalencia verdadera de la enfermedad (Schöls y col., 2004). Sin embargo, de manera global se tiene un índice de 3 en 100 000 habitantes, siendo SCA3 el subtipo más común a nivel mundial (Sullivan y col., 2019).

El subtipo SCA3 es el más común en Europa occidental, América del Norte, Brasil y China, por lo que se ha estimado que es la causa de la ataxia en el 21% de los pacientes en todo el mundo. Para el caso de SCA7 esta es ligeramente inferior con un 3-5%. Algunas variantes son muy raras, como es el caso de la SCA17, representando del 0 al 1% de las familias con SCA (Alonso, y col. 2007). Por otro lado, SCA2 es más frecuente en Cuba que SCA3, mientras que SCA7 es el subtipo más frecuente en Venezuela debido al fuerte efecto fundador (esto resulta cuando un cromosoma de un individuo portador de un alelo de enfermedad se introduce en una población por migración o por mutación de novo) y SCA6 es una de las más comunes en el norte de Inglaterra, con una prevalencia de 5,2/100.000 (Sullivan y col., 2019). Su distribución geográfica se representa en la Figura 2.

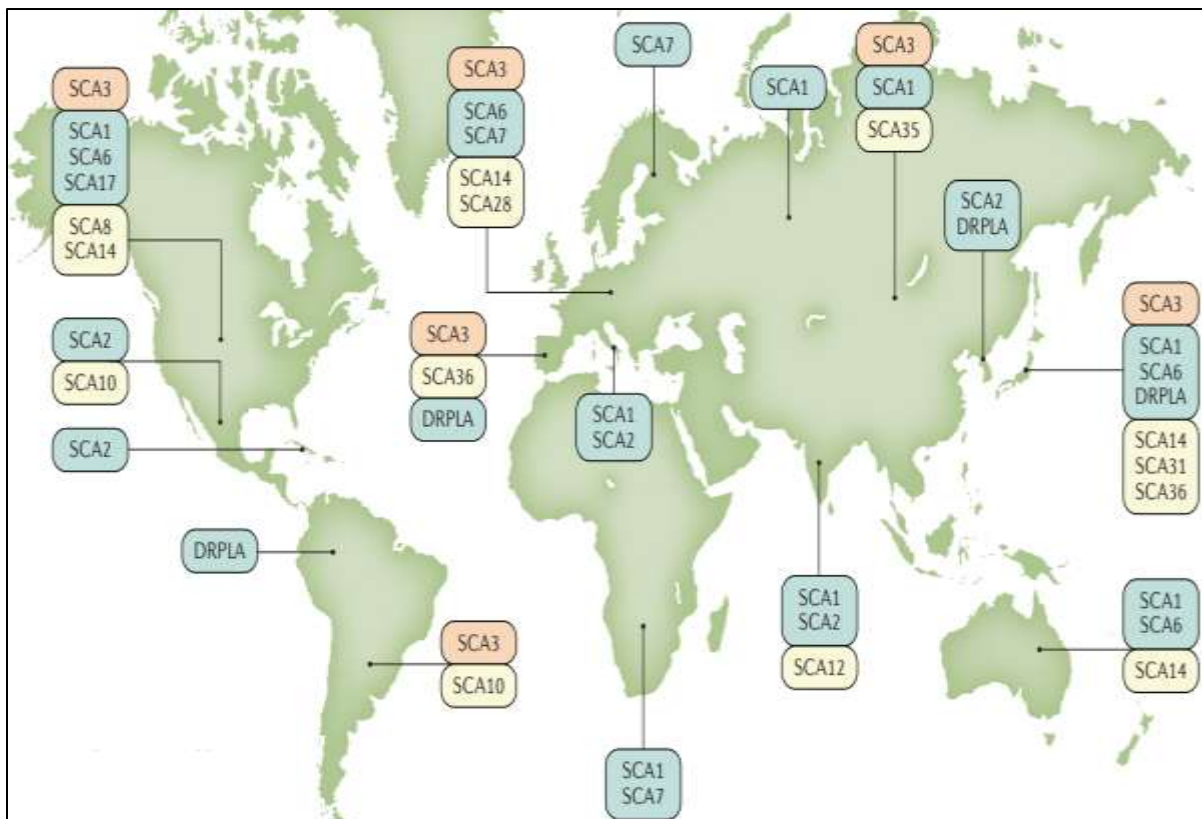


Figura 2. Representación esquemática de la prevalencia mundial de los subtipos de ataxia espinocerebelosa (SCA). (Modificado de Klockgether y col., 2019).

Tabla 1. Genética y Neuropatología de algunas SCA seleccionadas (Modificado de Klockgether y col., 2019).

SCA ^a	Gen (tipo de mutación)	Neuropatología
SCA's^a por mutaciones repetidas		
SCA1	<i>ATXN1</i> (repetición CAG traducida)	Cerebelo, tronco encefálico y médula espinal
SCA2	<i>ATXN2</i> (repetición CAG traducida)	Cerebelo, tronco encefálico, sustancia negra, médula espinal y polineuropatía
SCA3/MJD ^b	<i>ATXN3</i> (repetición CAG traducida)	Núcleo dentado, ganglios basales, sustancia negra, médula espinal y polineuropatía
SCA6	<i>CACNA1A</i> (repetición CAG traducida, sentido erróneo)	Cerebelo
SCA7	<i>ATXN7</i> (repetición CAG traducida)	Cerebelo, tronco encefálico, ganglios basales y retina
SCA8 ^c	<i>ATXN8</i> (repetición CTG en la 3' región no traducida)	Cerebelo
SCA10	<i>ATXN10</i> (repetición de ATTCT intrónico)	Cerebelo
SCA12	<i>PPP2R2B</i> (Repetición de CAG en la región 5' no traducida)	Cerebelo y polineuropatía
SCA17	<i>TBP</i> (repetición CAG traducida)	Cerebelo
SCA31	<i>BEAN1</i> (inserción de repetición TGGAA intrónico)	Cerebelo
SCA36	<i>NOP56</i> (repetición GGCCTG intrónico)	Cerebelo
SCA37	<i>DAB1</i> (repetición ATTTC intrónica)	Cerebelo
SCA's por mutaciones convencionales		
SCA5 ^d	<i>SPTBN2</i> (supresión, sentido erróneo)	Cerebelo
SCA13	<i>KCNC3</i> (sin sentido)	Cerebelo y tronco encefálico
SCA14	<i>PRKCG</i> (sin sentido)	Cerebelo
SCA15/SCA16 ^b	<i>ITPR1</i> (supresión grande, sentido erróneo)	Cerebelo
SCA 19/SCA22 ^b	<i>KCND3</i> (sin sentido)	Cerebelo
SCA28	<i>AFG3L2</i> (sin sentido)	Cerebelo

- a. Se muestran todas las SCA conocidas causadas por mutaciones repetidas y las SCA más prevalentes causadas por mutaciones convencionales.
- b. Se refiere a una sola enfermedad que ha recibido ambos nombres en la literatura.
- c. En SCA8, la penetrancia de la mutación *ATXN8* es incompleta.
- d. En SCA5, las mutaciones homocigotas de *SPTBN2* causan SCA de inicio infantil y retraso psicomotor. Conocidas causadas por mutaciones repetidas y las más prevalentes causadas por mutaciones convencionales.

Su distribución en México no se encuentra bien definida, no obstante, se ha encontrado que algunas variantes son muy raras o inexistentes en la mayoría de las poblaciones, como

es el caso de SCA10 y SCA12. En México, estudios previos llevaron a la identificación de la mutación SCA10, que desde entonces solo se ha reportado en familias mexicanas o brasileñas (Alonso, y col. 2007). Así mismo, el genotipo SCA2 ha sido uno de los más frecuente, ya que se ha reportado un índice del 43% de las familias que tienen SCA (Klockgether y col., 2019).

8.4 Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3)

La ataxia espinocerebelosa tipo 3, también conocida como enfermedad de Machado-Joseph (SCA3/MJD por sus siglas en inglés) es una ataxia de poliglutamina dominante (polyQ) que es causada por una expansión de repetición del trinucleótido CAG en la región codificante del gen ATXN3, localizado en el cromosoma 14q32.1 (Matos y col. 2019). La longitud de la repetición CAG expandida está inversamente correlacionada con la edad de inicio de los síntomas y explica hasta el 55% de la variabilidad en el inicio de la enfermedad (Leotti y col. 2021), esto hace referencia al “fenómeno de anticipación”, el cual se caracteriza por la disminución de la edad de inicio y el aumento de la gravedad de los síntomas de una la enfermedad neurodegenerativa (Choi y col., 2013). De acuerdo con Martindale, (2017) el número de repetidos normales de CAG es ≤ 44 y en el rango patogénico está entre 45 y ≥ 60 repetidos. El fenotipo clínico es muy variable por lo que algunos lo han clasificado en 4 subtipos que se describen a continuación:

- Tipo 1. Enfermedad de aparición temprana con signos extrapiramidales y espasticidad, pero ataxia mínima.
- Tipo 2. Ataxia progresiva de mediana edad.
- Tipo 3. Ataxia de inicio tardío acompañada de neuropatía, amiotrofia y pérdida de reflejos.
- Tipo 4. Parkinsonismo con o sin ataxia.

En cuanto a la neuropatología de SCA3, esta difiere de la de SCA1 y SCA2 en que la corteza cerebelosa y los núcleos olivares están relativamente menos afectados en SCA3, mientras que los núcleos cerebelosos profundos y la base del puente suelen estar más gravemente afectados (Paulson y col., 2017).

8.4.1 SCA3 y la proteína del gen ATXN3

La proteína del gen ATXN3 de la enfermedad SCA3 es una deubiquitinasa especializada (DUB) que está involucrada en el control de calidad de la proteína dependiente de la ubiquitina. Esta proteína tiene un dominio catalítico amino-terminal (denominado dominio Josephin) y una cola C-terminal flexible que incluye tres motivos de interacción con ubiquitina (UIM) que flanquean el tracto polyQ. Además, el dominio Josephin de ATXN3 contiene otros sitios de unión a ubiquitina que regulan la actividad catalítica y la estabilidad de la proteína. ATXN3 actúa preferentemente en cadenas más largas de al menos cuatro ubiquitinas de longitud (Paulson y col., 2017).

8.5 Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7)

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por ataxia cerebelosa, signos piramidales y distrofia retiniana. SCA7 es causada por la expansión de una repetición de CAG que se encuentra en la región codificante del gen ATXN7 en el cromosoma 3p12-13. Las personas con SCA7 en ocasiones pueden desarrollar otros déficits neurológicos como lo son la pérdida de destreza manual, disartria, disfagia y anomalías en el movimiento de los ojos (Hernández y col.,

2021). La expresión fenotípica de SCA7 es muy variable y depende del número de repeticiones CAG expandidas. Existe una fuerte correlación negativa entre el número de repeticiones CAG y la edad de inicio. En expansiones más grandes se producirá un curso más rápido, mientras que expansiones moderadas tienen una expectativa de vida casi normal o normal. El inicio de SCA7 suele ser entre la segunda y cuarta década, es decir, se manifiesta entre 18 a 41 años (Martin, 2012).

8.5.1 SCA7 y la proteína del gen ATXN7

La proteína de gen ATXN7 de la enfermedad de SCA7 es un componente del complejo acetiltransferasa SPT-ADA-GCN5 (complejo SAGA). SAGA regula ampliamente la transcripción a través de sus enzimas modificadoras de histonas duales, la histona acetiltransferasa GCN5 (también conocida como KAT2A) y la hidrolasa 22 C-terminal de ubiquitina DUB (USP22). Aunque ATXN7 en sí mismo no tiene actividad enzimática, ancla USP22 dentro del módulo DUB del complejo SAGA, mejorando la actividad DUB de SAGA. El ATXN7 in vitro, normal y expandido con polyQ mejora la actividad DUB por igual; sin embargo, in vivo, la ATXN7 expandida forma complejos insolubles que secuestran otros componentes del módulo DUB, de modo que el complejo SAGA ya no puede eliminar la ubiquitina de sus sustratos, incluida la histona H2B107. Se cree que este efecto negativo dominante de ATXN7 expandido, probablemente interrumpe el cuidadoso equilibrio entre la acetilación y la desubiquitilación mediada por SAGA, lo que lleva a cambios nocivos en la expresión génica que ayudan a precipitar la retina y la neurodegeneración en SCA7 (Paulson y col., 2017). El número de repetidos de CAG normales es de ≤ 19 y en el rango patogénico está entre 20 y ≥ 37 repetidos (Martindale, 2017).

8.6 Ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17)

SCA17 es una ataxia cerebelosa autosómica dominante causada por la expansión anormal de una repetición CAG/CAA que codifica un tracto de poliglutamina (polyQ) en el gen de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) en el cromosoma 6q. Los alelos del rango normal portan repetidos de CAG/CAA de 25 a 42 residuos de glutamina mientras que los alelos causantes de enfermedades portan de 43 a 63. SCA17 es una enfermedad compleja con una gran variabilidad fenotípica, se caracteriza por ataxia cerebelosa, demencia y movimientos involuntarios, que incluyen corea y distonía. Además, son comunes los síntomas psiquiátricos, los signos piramidales y la rigidez. La edad media de aparición es de unos 30 años para las personas con alelos de penetrancia completa (el 100% de los pacientes van a presentar la enfermedad) pero oscila entre los 3 y los 55 años de aparición (Toyoshima & Takahashi, 2018; Zühlke, & Bürk, 2007).

La estructura del tracto repetido en el gen TBP es compleja y se puede segmentar en cinco dominios representados del I al V (Figura 3), que consisten en combinaciones de codones CAG y CAA, que codifican glutamina que conduce a un tracto PolyQ puro (Nethisinghe, 2018).



Figura 3. Dominio I (rojo), Dominio II (marrón), Dominio III (verde), Dominio IV (azul) y Dominio V (púrpura), estos dominios son combinaciones de codones CAG/CAA (Nethisinghe, 2018).

Para conocer los subtipos de esta enfermedad es necesario aplicar ciertas técnicas moleculares que proporcionen esa información. Los fundamentos de estas técnicas se presentan a continuación.

8.7 Técnicas moleculares para el análisis de Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Para la aplicación de diversas técnicas de biología molecular es importante disponer de muestras de material genético de buena calidad, ADN/ARN, de las cuales se debe conocer tanto su concentración como su pureza.

8.7.1 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se hace mediante espectrofotometría, que es un método que permite que el ADN absorba luz ultravioleta (UV) a 260 nm permitiendo estimar su concentración. Para conocer la pureza del ADN se debe considerar la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Para un ADN puro la proporción aceptada es de 1.8, y si se tienen valores menores indica la presencia de proteínas (Velázquez y col., 2014).

Una vez cuantificado el ADN es necesaria realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificarlo.

8.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) “Punto Final”

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la producción (amplificación) rápida de millones a miles de millones de un segmento específico de ADN. La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, denominados cebadores que flanquean y permiten la amplificación en un gran número de copias de un segmento de interés del genoma (National Human Genome Research Institute , 2023).

8.7.3 Principio de la PCR

La PCR punto final consta de tres pasos: 1) desnaturalización térmica del ADN objetivo, 2) hibridación de cebadores sintéticos y 3) extensión de los cebadores hibridados por una ADN polimerasa. Estos pasos completan un ciclo el cual se repite varias veces en el que el número de moléculas del producto se va duplicando (Figura 4). Una vez concluidos los ciclos, el producto resultante tiene el tamaño determinado por la distancia entre los extremos 5' de los dos cebadores (Lo & Chan 2006).

Cuando se obtiene el producto de ADN después de la aplicación de PCR, a continuación, se puede realizar el análisis de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar. Sin embargo, para esto es importante conocer qué son los microsatélites y como pueden ser identificados a través de la electroforesis capilar.

8.7.4 Microsatélites

El genoma humano está compuesto por secuencias de copia única (por ejemplo, genes que codifican proteínas) y secuencias repetidas. Los microsatélites o STR (siglas en inglés: Short Tandem Repeats) son pertenecientes a un grupo de secuencias repetidas, pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos). Estas secuencias de repetición abarcan, generalmente, alrededor de 100 pares de bases (pb) que se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes (Gómez González & Prior de Castro, 2017; Vázquez & Morales 2014)

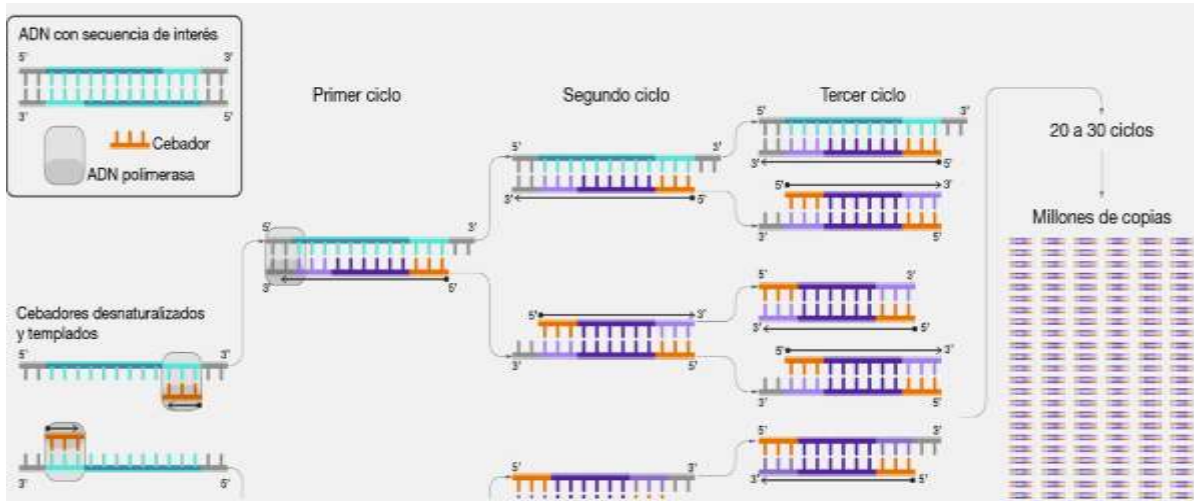


Figura 4. Ciclos de la PCR donde se producen de millones a miles de millones de copias de un segmento específico de ADN (National Human Genome Research Institute , 2023).

Algunos microsatélites están implicados en enfermedades causadas por mutaciones dinámicas, las cuales se caracterizan por la expansión o incremento en el número de repeticiones de un determinado microsatélite por encima de su intervalo normal (Gómez González & Prior de Castro, 2017). El polimorfismo de los microsatélites se atribuye a dos mecanismos de mutación: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN y el entrecruzamiento desigual. Cuando el ADN se está replicando pueden ocurrir alineamientos erróneos como se muestra en la Figura 5 (Vázquez & Morales 2014).

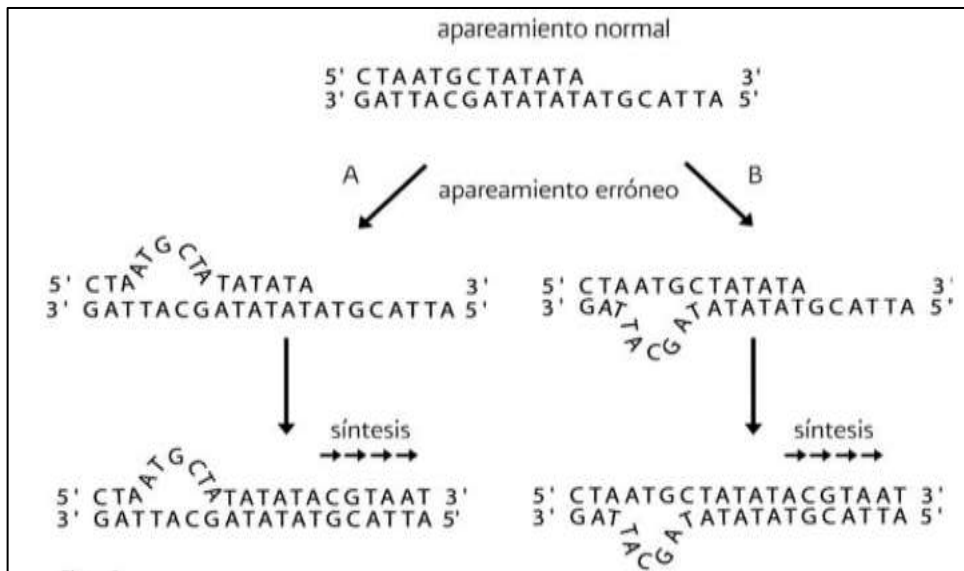


Figura 5. Mutación por alineamiento erróneo. En A, se muestra que la hebra nueva se pliega erróneamente causando una inserción del motivo TA. En B, la hebra parental se alinea erróneamente causando una deleción del motivo TA (Vázquez & Morales 2014).

El análisis molecular de los microsatélites se basa en la determinación del número de repeticiones, para ello, se lleva a cabo la aplicación de diferentes técnicas como el análisis de fragmentos a través de la electroforesis capilar, las cuales van a permitir la determinación

del diagnóstico diferencial de enfermedades, en este caso se aplica para Ataxia espinocerebelosa.

8.7.5 Análisis de fragmentos de ADN por medio de electroforesis capilar

El análisis de fragmentos permite determinar el tamaño de fragmentos de ADN a través de Electroforesis Capilar (EC), esta técnica está basada en la migración diferencial de moléculas sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50 μm de diámetro (Magaña y col., 2009).

Ahora bien, para llevar a cabo el análisis es necesario de disponer de una muestra de ADN, amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región donde se localiza el microsatélite a estudio, para esto es necesario que los cebadores estén marcados con un fluoróforo. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2023).

Una vez aplicada la electroforesis se analizan los resultados mediante un software, donde se obtiene que, por cada individuo se obtendrán, para un microsatélite dado, una de las siguientes posibilidades: 1) Dos fragmentos de diferentes tamaños. Esto sucede cuando el sujeto presenta un número de repeticiones distintas en cada alelo (heterocigoto) (Figura 5A) y 2) Un único fragmento. Esto en caso de que el sujeto presente el mismo número de repeticiones en ambos alelos (homocigoto), o que tenga un alelo normal y un alelo expandido que no se detecte por esta técnica, (Figura 6B).

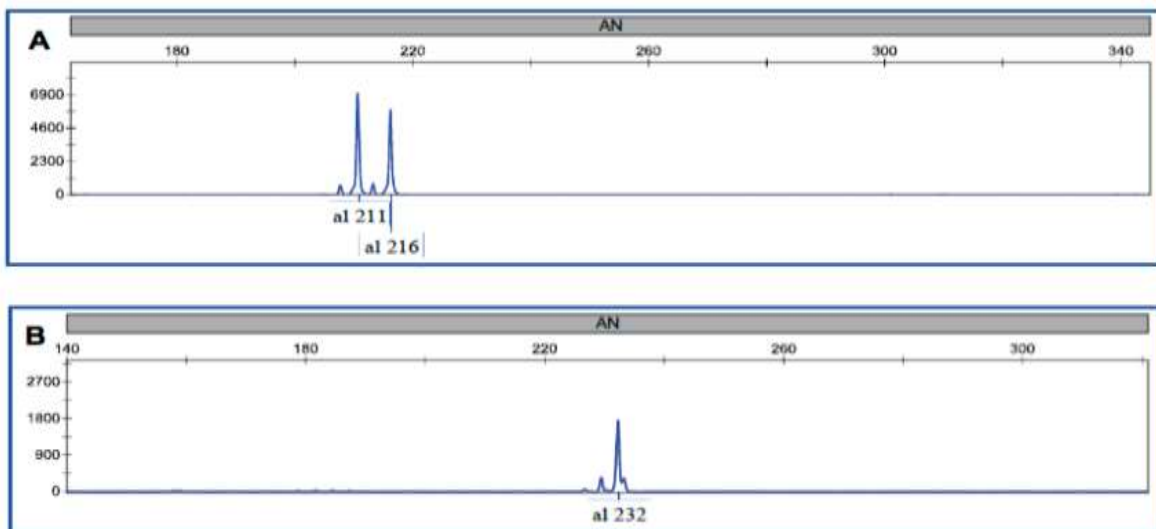


Figura 6. Resultados obtenidos del análisis de microsatélites amplificados por electroforesis capilar. En A, se observa dos fragmentos con un tamaño de 211 y 216 nucleótidos, uno por cada alelo y en B) se observa un fragmento con un tamaño de 232 nucleótidos, lo que sugiere que ambos alelos tienen el mismo tamaño (Gómez González & Prior de Castro, 2017).

Cuando se obtiene el tamaño de los fragmentos se puede calcular el número de repeticiones del microsatélite. Esto se representa en la Figura 7, donde los fragmentos obtenidos vienen dados por la pareja de cebadores que delimita la región que contiene el microsatélite (Gómez González & Prior de Castro, 2017).

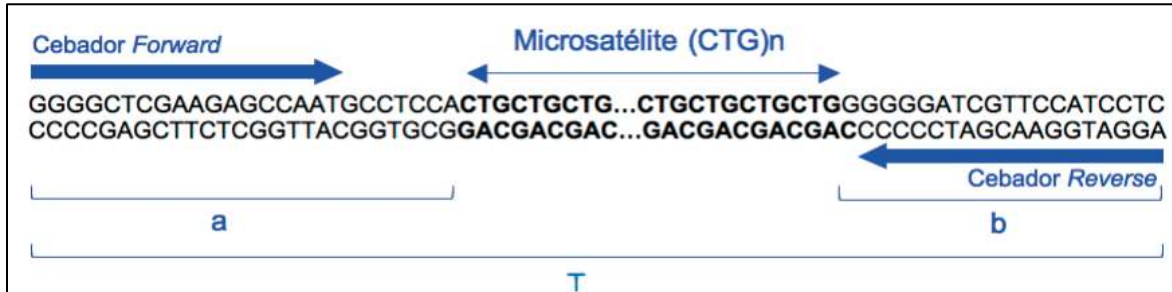


Figura 7. Se muestra la secuencia con un microsatélite con repeticiones de nucleótidos (CTG) n , en la que se representan los cebadores flanqueantes directo (Forward) e inverso (Reverse) y se marcan las variables (a, b) que son necesarias para el cálculo del número de repeticiones del microsatélite (n) a partir del tamaño de los fragmentos obtenidos por electroforesis capilar (T) (Gómez González & Prior de Castro, 2017).

Cuando se conoce el número de pb que flanquean la región del microsatélite (a + b) y el número de nucleótidos que componen el microsatélite (en el caso de la figura 5 está compuesto por repeticiones de 3 nucleótidos CTG) se puede calcular el número de repeticiones de este mediante la siguiente fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de repeticiones } (n) = \frac{T - (a + b)}{3}$$

Estas técnicas moleculares han demostrado ser útiles para el diagnóstico de enfermedades. Por lo tanto, en el presente trabajo han sido aplicadas para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de interés llamada ataxia espinocerebelosa que es causada por la expansión del microsatélite (CAG) n localizado en la región de los genes ATXN3, ATXN7 y ATXN17.

9 Materiales y Métodos

- ✓ Micropipeta de 2 μ L
- ✓ Micropipeta de 10 μ L
- ✓ Micropipeta de 100 μ L
- ✓ Micropipeta de 20 μ L
- ✓ Micropipeta de 200 μ L
- ✓ Puntillas estériles
- ✓ Microtubos 0.6 mL
- ✓ Microtubos PCR de 0.2 mL
- ✓ Microtubos 1.5 mL
- ✓ Placa con 96 pocillos

Equipo de análisis

- ✓ Agitador vortex (Genie 2)
- ✓ Espectrofotómetro de haz (Jenway™ UV/Visible modelo 7315)
- ✓ Centrifuga de placas
- ✓ Termociclador Digital
- ✓ Secuenciador (ABI PRISM 3130, Applied Biosystems).

Reactivos

- ✓ Agua inyectable

CEBADORES DIRECTOS (FORWARD)

- ✓ SCA3 (FAM-CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG)
- ✓ SCA7 (FAM-TAG GAG CGG AAA GAA TGT CG)
- ✓ SCA17 FAM-GCC AGC GCA CTC ACC CTC)

CEBADORES INVERSOS (REVERSE)

- ✓ SCA3 (TGG CCT TTC ACA TGG ATG TGA A)
- ✓ SCA7 (ACT TCA GGACTG GGC AGA GG)
- ✓ SCA17 (TTG ACT GCT GAA CGG CTG CA)
- ✓ Ampli Taq Gold 360 Master Mix
- ✓ 360 GC Enhancer
- ✓ Formamida
- ✓ Liz 500

10 Desarrollo experimental

10.1 Cuantificación de ADN

1. Se obtuvieron las muestras del banco de ADN.
2. Se homogeneizaron las muestras en el agitador vortex a una velocidad de 600 a 3200 rpm por 3 segundos.
3. Se calibró el espectrofotómetro con la ayuda de una micropipeta. Después se depositaron 3µL de muestra blanco en el espectrofotómetro y se leyó a λ 320 nm.
4. Se leyeron en el espectrofotómetro cada una de las muestras de ADN, agregando con la micropipeta 3 µL de muestra. (Se utilizó una puntilla diferente para cada muestra).
5. Se llevó a cabo un registro de la concentración (ng) y la pureza obtenida de cada muestra.
6. Posteriormente, se hicieron diluciones de las muestras leídas en microtubos de 1.5 mL, en las que se requiere preparar 50 µL que contengan 25 ng de ADN. Para esto se realizaron los cálculos adecuados para determinar cuánto se agregaría de cada una de las muestras y cuánto de agua.
7. Una vez preparadas las diluciones se homogeneizaron en el vortex durante 3 segundos.
8. Las muestras diluidas se leyeron en el espectrofotómetro donde se obtuvieron los valores de concentración (ng) y pureza.
9. Se realizaron los pasos de 4 al 8 para el proceso de los controles positivo y negativo.

10.2 Técnica de PCR

1. En un microtubo de 0.6 mL se preparó la mezcla con el kit de reactivos para PCR de la siguiente forma *:

- Cebador directo 1 μ L
- Cebador inverso 1 μ L
- Ampli Taq Gold 360 Master Mix 5 μ L
- 360 GC Enhancer 1.3 μ L
- Agua inyectable 1.7 μ L

2. El tubo con la mezcla anterior se homogeneizó en el vortex durante 3 segundos.

3. En microtubos para PCR de 0.2 mL, previamente rotulados con la identificación de cada muestra, se colocaron 10 μ L de la mezcla en cada uno.

4. Posteriormente, se requirió preparar 50 ng de ADN calculando la cantidad de ADN a agregar de cada muestra diluida a partir de su concentración (ng). Con esto se obtuvo la cantidad que se añadió a cada tubo que contenía una porción de la mezcla.

5. Una vez preparados los tubos deseados se colocaron en el vortex durante 3 segundos para homogeneizar. Después se llevaron al termociclador.

Las condiciones estandarizadas fueron las siguientes:

Desnaturalización

- Temperatura: 94°C
- Tiempo: 1 min.

Hibridación

- Temperatura: 56°C
- Tiempo: 1 min.

Elongación

- Temperatura 72°C
- Tiempo: por 2 min.

Estas tres temperaturas completan un ciclo y vuelve a iniciar hasta completar 30 ciclos.

* El volumen de la mezcla dependió del número de muestras analizadas, considerando un control (+) y un control (-). Por lo que, cada cantidad de reactivo se multiplica por el número total de muestras a procesar, esto nos da la cantidad exacta necesaria de cada reactivo.

10.3 Electroforesis capilar

El producto de PCR obtenido a partir de cada una de las muestras se preparó para su análisis en el secuenciador.

1. Se preparó una segunda mezcla que contenía formamida y un marcador de peso molecular fluorescente (Liz 500). Las cantidades fueron *: Formamida 9.7 μ L y Liz 500 0.3 μ L.
2. En una placa con 98 pocillos se agregaron 3 μ L de cada muestra del producto de PCR (utilizando solo los pocillos correspondientes a cada muestra).
3. Una vez colocada la muestra del producto de PCR en cada pocillo, se añadieron 10 μ L de la mezcla preparada previamente en cada uno de los pocillos que contenía el producto de PCR.
4. La placa se centrifugó durante 2 min a 3000 r.p.m. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación la placa se coloca en el termociclador por 5 minutos para su desnaturalización. Posteriormente, la placa se colocó inmediatamente en un baño de hielo para hacer un choque térmico y así evitar que la enzima se degrade.
5. La placa se llevó enseguida al secuenciador para el análisis de las muestras.
6. Una vez obtenidos los electroferogramas se obtuvieron los tamaños de cada fragmento generado y se interpretaron para determinar el resultado.

11 Resultados y Análisis de Resultados

Se estudió un grupo de 124 pacientes para la determinación de los repetidos patológicos de la enfermedad de ataxia espinocerebelosa, de los cuales 56 (45%) fueron mujeres y 68 (55%) fueron hombres, con un rango de edad de entre 8 a 70 años.

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada una de las SCA's.

11.1 Casos con diagnóstico de SCA3

Durante la determinación de los repetidos para SCA3 se hizo el análisis de 31 muestras, de las cuales 14 (45%) eran mujeres y 17(55%) eran hombres, con un rango de edad de 8 a 56 años. Una de las muestras analizadas no amplificó, por lo tanto, solo se logró obtener los datos de 30 muestras.

En la tabla 2, se reportan las muestras que obtuvieron repeticiones normales, repeticiones expandidas, así como de las muestras que no amplificaron.

Tabla 2. Muestras con repetidos normales y repetidos expandidos para SCA3.

Muestras	No. muestras	%
Normales	27	87
Expandidos	3	10
No amplificaron	1	3

* El volumen de la mezcla dependió del número de muestras analizadas, considerando un control (+) y un control (-). Por lo que, cada cantidad de reactivo se multiplica por el número total de muestras a procesar, esto nos da la cantidad exacta necesaria de cada reactivo.

Se determinó el porcentaje de la frecuencia alélica de cada número de repeticiones obtenidos. Estos datos se observan en la figura 8.

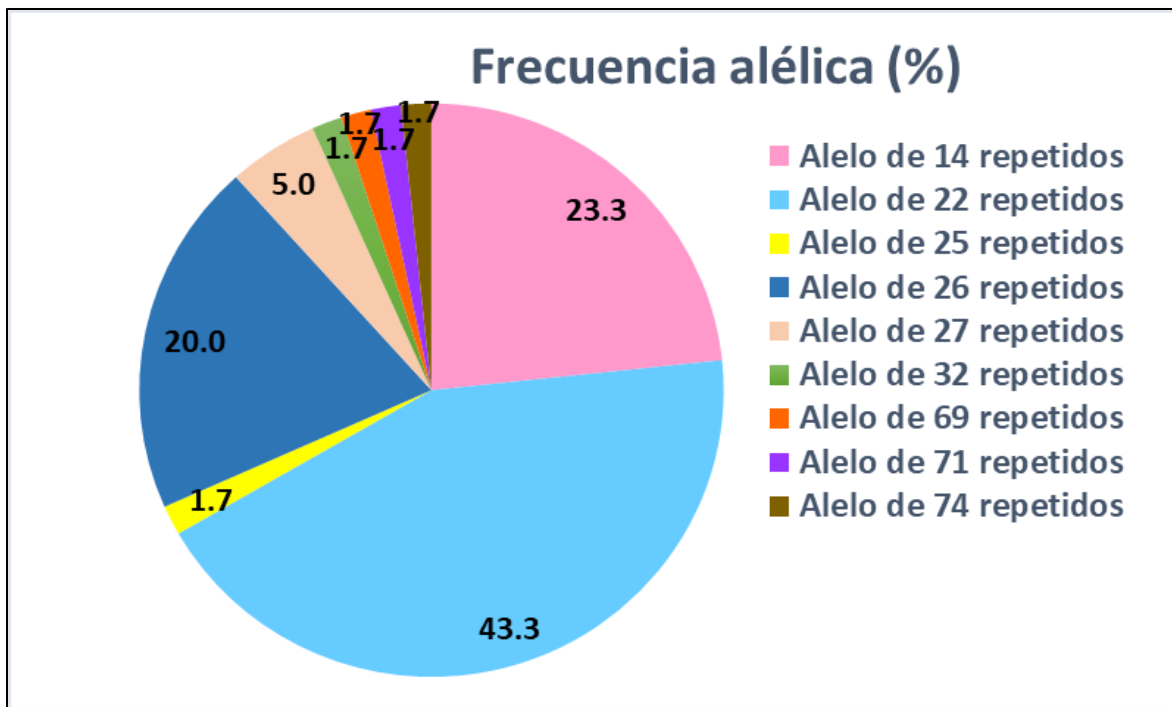


Figura 8. Porcentaje de la frecuencia alélica para SCA3. El alelo menor es el alelo de 14 repeticiones, el alelo mayor es el de 74 repeticiones y alelo en mayor proporción es el de 22 repeticiones, seguido de los alelos de 14 y 26 repeticiones, para los alelos con 25, 27, 32, 69, 71 y 74 repeticiones son los que presentan una menor frecuencia.

11.2 Casos con diagnóstico de SCA7

En la determinación de los repeticiones para SCA7 se analizaron 102 muestras, donde se tenían 48 (47%) mujeres y 54 (53%) hombres, el rango de edad es de 7 a 70 años y con un promedio de 37 años. Durante el análisis 8 muestras no amplificaron, por lo tanto, solo se pudieron obtener los valores de 94 muestras.

En la tabla 3, se reporta la cantidad de muestras que obtuvieron repeticiones normales, repeticiones expandidas, así como de las muestras que no amplificaron.

Tabla 3. Muestras con repeticiones normales y repeticiones expandidas para SCA7.

Muestras	No. muestras	%
Normales	94	92
Expandidos	0	0
No amplificaron	8	8

Se determinó el porcentaje de la frecuencia alélica de cada número de repeticiones obtenidos. Esto se puede observar en la figura 9.

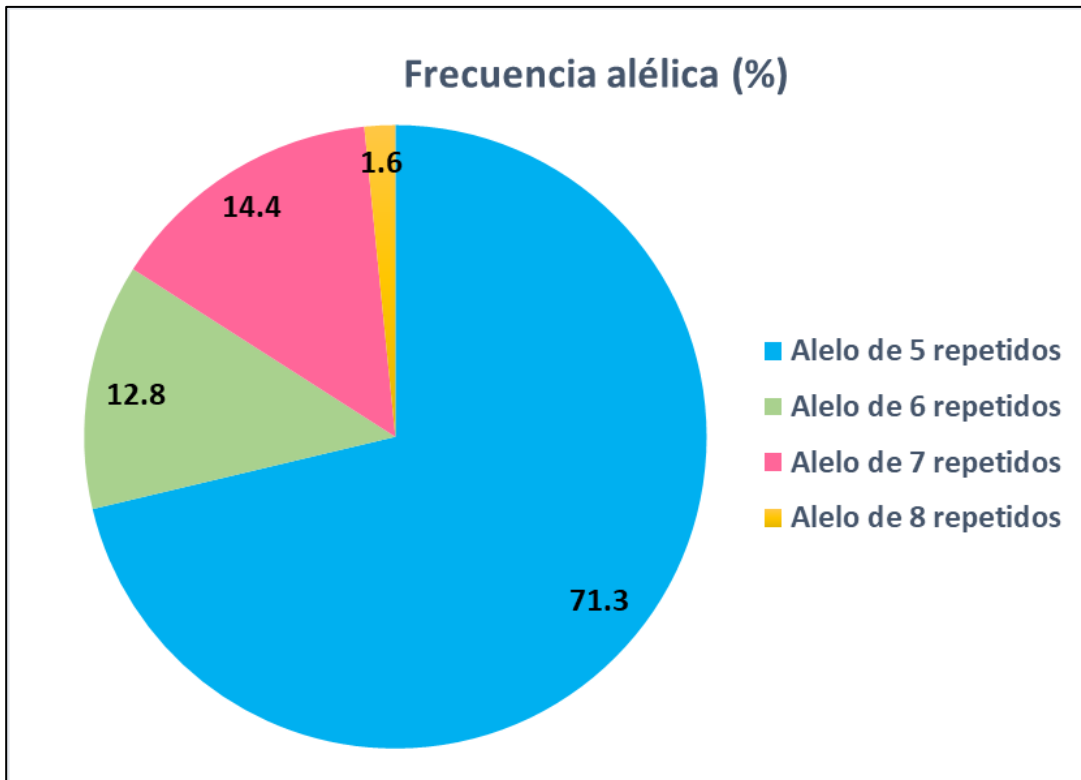


Figura 9. Porcentaje de la frecuencia alélica para SCA7. El alelo más frecuente es el de 5 repetidos con un 71.3 %, el alelo 6 y el alelo 7 tienen una frecuencia similar, ya que tienen un valor de 12.8% y 14.4%, respectivamente, por último, el alelo de 8 repetidos fue el alelo menor y el que tuvo una menor frecuencia, siendo esta de 1.6%.

11.3 Casos con diagnóstico de SCA17

Para la determinación de los repetidos se analizaron 101 muestras de las cuales 5 de ellas no amplificaron, por lo tanto, solo se logró obtener los datos de 96.

En la tabla 4, se reportan las muestras que obtuvieron repeticiones normales, repeticiones expandidas, así como de las muestras que no amplificaron.

Tabla 4. Muestras con repetidos normales y repetidos expandidos para SCA17.

Muestras	No. muestras	%
Normales	96	95
Expandidos	0	0
No amplificaron	5	5

En la Figura 10 se puede observar el porcentaje de la frecuencia alélica de cada número de repetidos obtenidos.

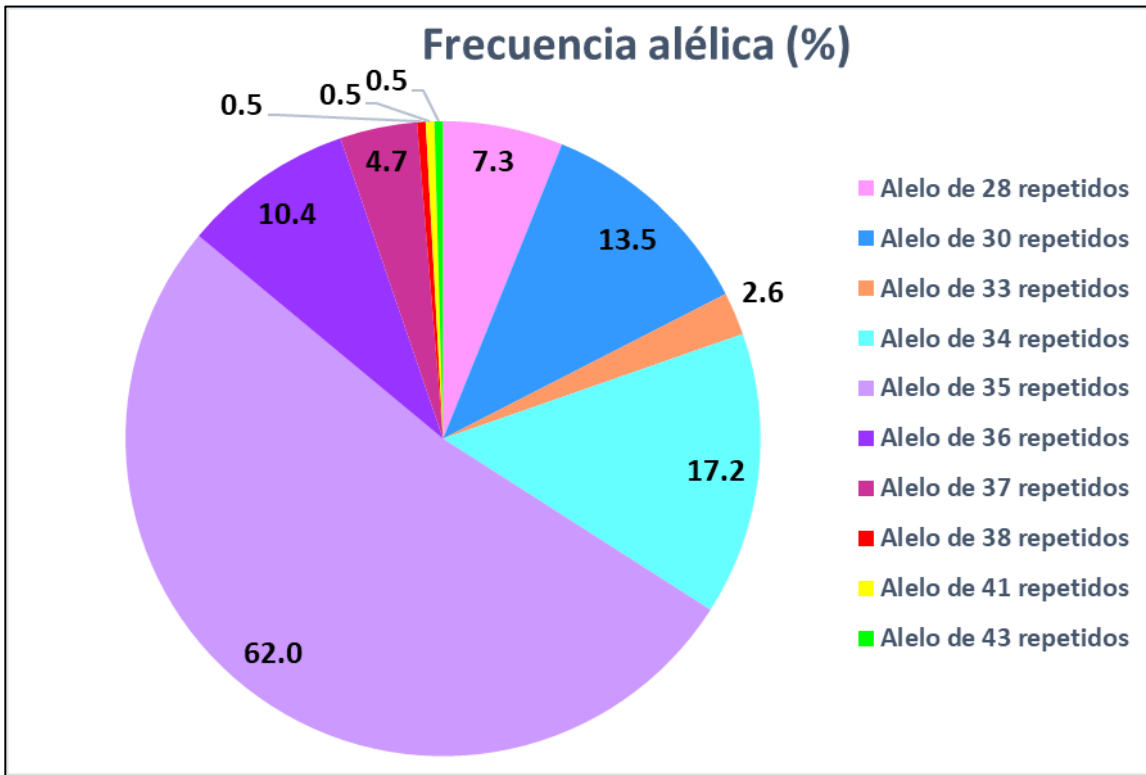


Figura 10. Porcentaje de la frecuencia alélica para SCA17. El alelo más frecuente es el 35 con un 62%, el alelo 28 es el alelo menor y con frecuencia intermedia de 7.3%, los alelos 30, 33, 34, 36, y 37 también presentan una frecuencia intermedia de 13.5%, 2.6%, 17.2%, 10.4% y 4.7%, respectivamente. Finalmente, los alelos 38, 41 y 43 tienen una frecuencia menor siendo de 0.5%, así mismo el 43 fue el alelo mayor.

12 Discusión

En los diferentes tipos de ataxias espinocerebelosas que existen, sus signos y síntomas suelen ser muy similares, lo que las hace difícil de diagnosticar. Así mismo, su distribución en México no se encuentra bien definida, por lo que sigue estando en estudio, y debido a esto se planteó la hipótesis de que la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico de las SCA's, ayudará a realizar la diferenciación entre ellas y proporcionará datos sobre su frecuencia en México, y con ello se logrará crear grupos de estudios para el desarrollo de nuevos tratamientos específicos para cada una de las SCA's. Para abordar esta hipótesis, se analizó a un grupo de pacientes con probable SCA. El objetivo fue llevar a cabo el diagnóstico molecular para las ataxias espinocerebelosas SCA3, SCA7 y SCA17 de un grupo de pacientes mexicanos con ataxia espinocerebelosa, mediante análisis de fragmentos de tripletes repetidos de CAG en muestras de ADN seleccionadas.

En un estudio realizado por Alonso y col. (2007) se analizó a un grupo de pacientes mestizos mexicanos con ataxias cerebelosas autosómicas dominantes y ataxias esporádicas, donde determinaron la frecuencia relativa de cada SCA. Ellos obtuvieron que la mutación más frecuente fue de SCA2, seguida de SCA10, SCA3, SCA7 y finalmente

SCA17. Para el caso de SCA3 obtuvieron una frecuencia de 12%, para SCA7 un 7.4% y para SCA17 fue un valor menor siendo este de 2.8%. De manera similar en el presente estudio también obtuvimos expansiones para SCA3 a pesar de que el grupo estudiado fue pequeño; para SCA7 y SCA17 no se obtuvieron expansiones, esto demuestra que SCA3 fue más frecuente.

En otro estudio realizado por Gómez y col. (2022) a una población de nativos americanos mexicanos, encontraron que la distribución alélica de los loci de microsatélites varía hasta cierto punto entre las poblaciones. Ellos reportan que para SCA3 tuvieron mayor diversidad de repetidos, obteniendo alelos de 23 repetidos y para SCA7 obtuvieron alelos de 8 repetidos. En este caso para SCA3 el alelo más frecuente fue el de 22 repetidos, y en el caso SCA7 para el alelo más frecuente, ellos obtuvieron alelos de 8 repetidos y en este estudio fue de 5 repetidos, lo que nos indica que hay similitud entre la frecuencia alélica.

Por otro lado, Magaña y col. (2013) llevaron a cabo un estudio en el estado de Veracruz, México, para el diagnóstico diferencial de SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 y SCA7 en un grupo de pacientes. Ellos identificaron 55 pacientes con SCA7 y 9 con SCA2, esto les arrojó una prevalencia muy alta para SCA7, ya que reportan hasta un 85.94%. Esto podría deberse a que ellos realizaron el estudio en una región en específico y en contraste con lo reportado en el presente análisis, para el caso de SCA7, fue realizado en pacientes en general y no sé obtuvo ningún caso.

Como se menciona en Klockgether y col. (2019), la SCA3 es la más frecuente en todo el mundo. En el caso de SCA7 es alta en ciertas regiones del mundo, por ejemplo, Escandinavia, Sudáfrica y México. Finalmente, SCA17 pertenece a las SCA's que tienen la frecuencia más baja en todo el mundo. La frecuencia de las SCA's es relativa en todo el mundo, ya que depende de zona geográfica y de las etnias.

Haciendo un análisis de lo reportado en este estudio, se cree que, para obtener una frecuencia más acertada sobre la población mexicana, es necesario llevar a cabo un estudio con una muestra de mayor volumen de pacientes, ya que esto nos proporcionaría mayor certidumbre sobre la frecuencia en la población mexicana.

Las ataxias espinocerebelosas son enfermedades consideradas como raras y el impacto que tienen sobre las personas que la padecen es alto, ya que en la actualidad siguen siendo enfermedades en estudio.

En la actualidad se están obteniendo avances en el campo de la genética, con el propósito de comprender las funciones y disfunciones neuronales y así permitir el estudio y desarrollo de posibles terapias.

13 Conclusión

Al aplicar las técnicas moleculares se logró obtener el diagnóstico de algunas de las muestras analizadas para SCA3. Sin embargo, para SCA7 y SCA17 no se obtuvieron expandidos, por lo tanto, se descarta que el grupo de pacientes analizados presenten algunos de estos dos subtipos.

Debido a que existe un número grande de ataxias, es necesario que para los pacientes en los que no se obtuvo un diagnóstico de los subtipos de las SCA's analizadas, se les realice el diagnóstico molecular para detectar otros de los subtipos de SCA's y así poder darle un diagnóstico certero.

Por otro lado, se cree que las muestras que no amplificaron pudieron ser debido a la mala calidad del material genético, esto porque algunas de ellas quizás se encontraban contaminadas o tenían bastante tiempo guardadas, y debido a que el ADN es una molécula muy sensible, algún cambio en las condiciones como la temperatura pudo haber afectado su composición degradando el material genético.

Este estudio aportó información para conocer la frecuencia de las SCA's tipo 3, 7 y 17 en población mexicana, siendo SCA3, así como en otras partes del mundo la más frecuente en una población. En contraste se demuestra que SCA7 y SCA17 son subtipos de ataxia que son menos frecuentes en la población mexicana, estos resultados coinciden con lo reportado en otras poblaciones de diferentes partes del mundo.

14 Perspectivas del presente estudio

Es importante seguir analizando muestras de pacientes con probable SCA, esto con el fin de obtener un buen diagnóstico sobre el subtipo de SCA que presentan, y así poder separar en grupos determinados de acuerdo con el subtipo, esto con el fin de conocer los signos y síntomas, ya que muchos de ellos se traslapan entre sí. Y una vez divididos en grupos se pueden observar algunas diferencias que se puedan presentar entre ellos, esto servirá para dar el tratamiento adecuado para cada paciente.

Debido a que actualmente no existe un tratamiento para retardar o detener las SCA, es importante seguir llevando a cabo estudios moleculares que permitan la comprensión de la patología de muchas de las SCA's, en la que se conozca lo que ocurre a través de los mecanismos que generan la toxicidad en los genes que tienen la mutación. Esto ayudará a plantear objetivos para el desarrollo de mejores tratamientos que proporcionen al paciente una mejor calidad de vida.

15 Referencias

1. Alonso, E., Martínez-Ruano, L., De Biase, I., Mader, C., Ochoa, A., Yescas, P., Rasmussen, A. (2007). Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Movement Disorders*, 22(7), 1050–1053. Doi:10.1002/mds.21470
2. Coutelier, M., Coarelli, G., Monin, M. L., Konop, J., Davoine, C. S., Tesson, C., Valter, R., Anheim, M., Behin, A., Castelnovo, G., Charles, P., David, A., Ewenczyk, C., Fradin, M., Goizet, C., Hannequin, D., Labauge, P., Riant, F., Sarda, P., Sznajer. (2017). A panel study on patients with dominant cerebellar ataxia highlights the frequency of channelopathies. *Brain: a journal of neurology*, 140(6), 1579–1594. <https://doi.org/10.1093/brain/awx081>
3. Choi, K. D., Yook, J. W., Kim, M. J., Kim, H. S., Park, Y. E., Kim, J. S., Choi, J. H., Shin, J. H., & Kim, D. S. (2013). Possible anticipation associated with a novel splice site mutation in episodic ataxia type 2. *Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 34(9), 1629–1632. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1298-8>
4. Duran-Herrera, C., & Querol-Pascual, M. R. (2011). Ataxias hereditarias y patología cerebelosa. *Medicine – Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 4965-4972. [https://doi.uam.elogim.com/10.1016/S0304-5412\(11\)70039-7](https://doi.uam.elogim.com/10.1016/S0304-5412(11)70039-7).
5. Gómez, R., Tapia-Guerrero, YS, Cisneros, B., Orozco, L., Cerecedo-Zapata, C., Mendoza-Caamal, E., ... & Magaña, JJ (2022). Distribución genética de cinco loci de microsatélites de ataxia espinocerebelosa en poblaciones nativas americanas mexicanas y su impacto en poblaciones mestizas contemporáneas. *Genes*, 13 (1), 157.
6. Hernández-Castillo, C. R., Diaz, R., Rezende, T., Adanyeguh, I., Harding, I. H., Mochel, F., & Fernandez-Ruiz, J. (2021). Cervical Spinal Cord Degeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 42(9), 1735–1739. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A7202>
7. Klockgether, T., Mariotti, C., & Paulson, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3>
8. Leotti, V. B., de Vries, J. J., Oliveira, C. M., de Mattos, E. P., Te Meerman, G. J., Brunt, E. R., Kampinga, H. H., Jardim, L. B. y Verbeek, D. S. (2021). El tamaño de repetición CAG influye en la tasa de progresión de la ataxia espinocerebelosa tipo 3. *Anales de neurología*, 89(1), 66–73. <https://doi.org/10.1002/ana.25919>
9. Lo, Y. M., & Chan, K. C. (2006). Introduction to the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 336, 1–10. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:1>
10. Magaña, J. J., Tapia-Guerrero, Y. S., Velázquez-Pérez, L., Cerecedo-Zapata, C. M., Maldonado-Rodríguez, M., Jano-Ito, J. S., Leyva-García, N., González-Piña, R., Martínez-Cruz, E., Hernández-Hernández, O., & Cisneros, B. (2013). Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clinical genetics*, 85(2), 159–165. <https://doi.org/10.1111/cge.12114>
11. Magaña, J. J., Arenas-Sordo, M. D. L. L., & Gómez, R. (2009). La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista médica de Chile*, 137(7), 946-956.
12. Martin J. J. (2012). Spinocerebellar ataxia type 7. *Handbook of clinical neurology*, 103, 475–491. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51892-7.00030-9>

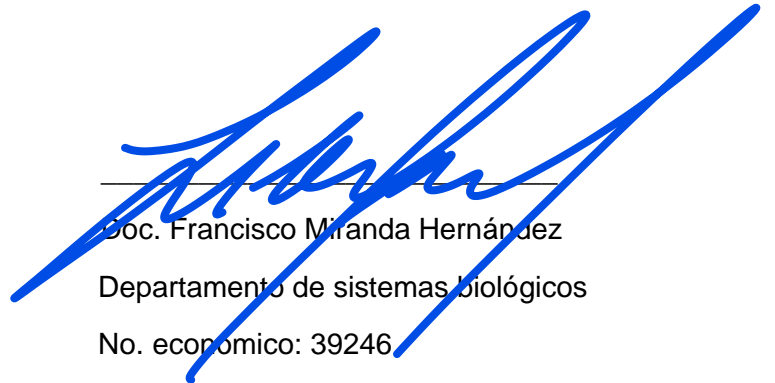
13. Martindale, J.E. (2017). Diagnosis of spinocerebellar ataxias caused by trinucleotide repeat expansions. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 92:9.30.1-9.30.22. doi: 10.1002/cphg.30
14. Matos, C. A., de Almeida, L. P., & Nóbrega, C. (2019). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *Journal of neurochemistry*, 148(1), 8–28. <https://doi.org/10.1111/jnc.14541>
15. National Human Genome Research Institute (28 de Abril de 2023). Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>
16. Nethisinghe, S., Lim, W. N., Ging, H., Zeitlberger, A., Abeti, R., Pemble, S., Sweeney, M. G., Labrum, R., Cervera, C., Houlden, H., Rosser, E., Limousin, P., Kennedy, A., Lunn, M. P., Bhatia, K. P., Wood, N. W., Hardy, J., Polke, J. M., Veneziano, L., Brusco, A., ... Giunti, P. (2018). Complexity of the Genetics and Clinical Presentation of Spinocerebellar Ataxia 17. *Frontiers in 26elular neuroscience*, 12, 429. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00429>
17. Orozco-Gutiérrez, M. H., Cervantes-Aragón, I., & García-Cruz, D. (2017). Consideraciones éticas en el diagnóstico presintomático de ataxias espinocerebelosas autosómico dominantes. *Neurología*, 32(7), 469–475. Doi: 10.1016/j.nrl.2015.06.004
18. Paulson, HL, Shakkottai, VG, Clark, HB y Orr, HT (2017). Ataxias espinocerebelosas de poliglutamina: desde los genes hasta los posibles tratamientos. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(10), 613–626. Doi:10.1038/nrn.2017.92
19. Sullivan, R., Yau, W. Y., O'Connor, E., & Houlden, H. (2019). Spinocerebellar ataxia: an update. *Journal of neurology*, 266(2), 533–544. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9076-4>
20. Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. y Riess, O. (2004). Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes: características clínicas, genética y patogenia. *The Lancet Neurology*, 3(5), 291–304. Doi:10.1016/s1474-4422(04)00737-9
21. Thermo Fisher Scientific Inc. (01 de enero de 2023). Thermo Fisher Scientific. Obtenido de DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/global/forms/fragment-analysis-guide-registration-form/fragment-analysis-guide-thank-you.html?status=1000&form-submit-token=828d66ebc3673c30ea87145db0fc2957&form-submit-id=60294>
22. Toyoshima, Y., & Takahashi, H. (2018). Spinocerebellar Ataxia Type 17 (SCA17). *Advances in experimental medicine and biology*, 1049, 219–231. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_10
23. Trott, A. y J. Houenou, L. (2012). Mini-Revisión: Ataxias espinocerebelosas: una actualización de los genes SCA. *Patentes recientes sobre ADN y secuencias de genes*, 6(2), 115–121.
24. Perrone, L y Melone, M. (2008). New Targets for Therapy in Polyglutamine (polyQ) Expansion Diseases, *Current Drug Therapy*. Bentham Science Editor, 3(3). <https://dx.doi.org/10.2174/157488508785747835>
25. Vázquez lobo Yurén, A., & Morales García, A. (2014). Microsatélites. En *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos* (págs. 75-95). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

26. Zühlke, C., & Bürk, K. (2007). Spinocerebellar ataxia type 17 is caused by mutations in the TATA-box binding protein. *Cerebellum (London, England)*, 6(4), 300–307. <https://doi.org/10.1080/14734220601136177>

Vo. Bo de los asesores del proyecto



Doc. Aurelio Jara Prado
Investigador en ciencias médicas
Cédula: 4450675



Doc. Francisco Miranda Hernández
Departamento de sistemas biológicos
No. económico: 39246