



**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco**



División de ciencias biológicas y de la salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

“Análisis de la variante rs41524547 (C/G) en el gen ATXN10 como biomarcador para el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 10 (SCA10) mediante el uso de la PCR-RFLP en pacientes mexicanos”

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y microbiológico de productos relacionados con la salud

Presenta: Keila Mejía Aguilar

Asesor externo: Dr. Aurelio Jara Prado

Asesor interno: Dr. Francisco Miranda Hernández

**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía- Manuel Velasco Suarez
(INNN-MVS)**

Enero 2022- Enero 2023

Índice

Introducción	3
Ataxia	4
Ataxia espinocerebelosa	4-5
Ataxia espinocerebelosa tipo 10	5-6
Repeticiones cortas en tándem	6-7
ATXN10	7-8
Variante rs41524547	8-9
Diagnóstico molecular SCA10	9
Biomarcadores	10
PCR-RFLP	10
Enzima Acil	11
Justificación	12
Objetivos	13
Materiales y métodos	14-18
Resultados	19-21
Discusión	22-23
Conclusión	24
Citas bibliográficas	25-27

1. Introducción

Las ataxias espinocerebelosas (SCA) son un grupo de trastornos neurodegenerativos raros, que se caracterizan por una disfunción cerebelosa progresiva, principalmente ataxia de la marcha.¹ La ataxia espinocerebelosa de tipo 10 (SCA10) es causada por la expansión del STR (*Short tandem repeats*, "repeticiones cortas en tándem") ATTCT, en el intrón 9 del gen *ATXN10*, localizado en el cromosoma 22q13.31. Un alelo normal contiene de 10 a 32 repeticiones, mientras que los alelos de las personas afectadas con SCA10 presentan hasta 4500 repeticiones ATTCT; se han observado alelos que van desde 280 a 370 repeticiones, los cuales se consideran alelos intermedios con penetrancia reducida, lo cual se refiere a las personas asintomáticas.² Se ha observado en un 2-4% de la población de América Latina y del Este de Asia, la presencia de un haplotipo ancestral y estudios recientes sugieren que el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), rs41524547 (C>G) presente en el gen *ATXN10*, tiene relación con los expandidos implicados en la patogénesis de SCA10.^{3,4}

Actualmente, los avances de la genómica y la biología molecular han contribuido a la nueva era de biomarcadores, los cuales son empleados en medicina clínica por su uso prometedor en el diagnóstico temprano o confirmatorio y el tratamiento eficaz de muchas enfermedades; además, permiten un pronóstico y la identificación de diferentes subtipos de enfermedades.⁵ Los diferentes tipos de ataxia requieren de un diagnóstico eficaz para diferenciar y confirmar el tipo específico de SCA que presenta cada persona afectada, ya que, esto permite que cada paciente reciba un tratamiento específico adecuado. La presente investigación busca identificar el SNP, (rs41524547 C/G), como un posible biomarcador y su empleo en un tamizaje previo en el diagnóstico molecular de SCA10, mediante la implementación de la técnica de PCR-RFLP.

2. Marco teórico

2.1 Ataxia

El término ataxia fue utilizado por primera vez en 1858 por Duchenne, para describir la falta de coordinación sensorial en la columna dorsal, tiempo después en 1863 se designó para describir el síndrome de Friedreich. Actualmente, la ataxia (del griego a- “sin” y taxia- “orden”) se define como la alteración de la coordinación del movimiento de los músculos voluntarios.^{2, 6} La prevalencia global estimada de ataxias es de 15-20 individuos por cada 100,000 habitantes.⁷

Las ataxias pueden ser de origen hereditario, ya sea del tipo autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al cromosoma X y mitocondrial; pueden ser adquiridas, que incluyen causas no genéticas como, alcoholismo, deficiencias vitamínicas, esclerosis múltiple, enfermedad vascular, tumores primarios o metastásicos; y de origen esporádico, es decir, sin un defecto genético definido o una etiología definida.^{2,8} La tasa de prevalencia estimada de ataxia cerebelosa hereditaria dominante es de 2.7/100000 y para ataxia cerebelosa hereditaria recesiva es de 3.3/100000.⁹

2.2 Ataxia espinocerebelosa

Las ataxias espinocerebelosas (SCA) son un grupo de trastornos neurodegenerativos raros, genética y clínicamente heterogéneos, caracterizados por una disfunción cerebelosa progresiva.¹ Dentro de las manifestaciones clínicas de las SCA, se presentan, mala coordinación del movimiento y una marcha inestable y descoordinada, además de una mala coordinación de las extremidades y del habla (disartria).⁶

Las SCA pertenecen al grupo de ataxias hereditarias que se transmiten de forma autosómica dominante. Existen varios tipos, los cuales se clasifican según la mutación del gen responsable del tipo de SCA específico; actualmente, se han

reportado al menos 48 loci genéticos y se han identificado alrededor de 22 genes asociados con las SCA.^{1, 6} Las SCA también pueden ser agrupadas de acuerdo con su fisiopatología molecular específica, por lo que, se derivan 3 grupos: I) Debidas a expansiones repetidas de CAG codificantes de poliglutamina (SCA1-3, 6, 7, 17); II) Debidas a expansiones repetidas no codificantes (SCA8, 10 Y 12) o inserción (SCA31); y III) Aquellas causadas por mutaciones puntuales (SCA 5, 11, 13-15 y 27).¹⁰

La prevalencia de las SCA varía según la distribución étnica en las diferentes áreas del mundo donde se han estudiado. Se ha observado que la prevalencia global es de 3 individuos por cada 100,000.¹¹ A nivel mundial, SCA3 es el subtipo más común de SCAs; SCA6 tiene una prevalencia global de 5.2/100,000, siendo de las más comunes en el norte de Inglaterra; SCA7 es el subtipo más frecuente en Venezuela, mientras tanto SCA10 es la segunda SCA más común de América Latina, específicamente presente en México y Brasil.^{10, 11}

2.3 Ataxia espinocerebelosa tipo 10

La ataxia espinocerebelosa tipo 10 (SCA10) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por disfunción cerebelosa progresiva, cuya base molecular radica en la expansión de repeticiones del pentanucleótido (ATTCT) en el intrón 9 del gen *ATXN10* en el cromosoma 22q13.3.¹² Dentro de los síntomas más comunes se encuentran ataxia de la marcha, disartria, disfagia y en algunos casos se han observado crisis epilépticas, capacidad cognitiva reducida y depresión.¹² Sin embargo, estas manifestaciones clínicas varían de acuerdo a la población, por ejemplo, en el caso de México, las familias que padecen SCA10, presentan ataxia cerebelosa acompañada de epilepsia y otros síntomas extracerebelosos, como deterioro cognitivo y polineuropatía sensorial. En Brasil, en contraste, el fenotipo más común de ataxia es la cerebelosa pura.¹³

La SCA10 muestra una distribución geográfica en poblaciones del continente americano, principalmente aquellas con mezclas amerindias.¹² Previo al descubrimiento del gen *ATXN10*, se pensaba que SCA10 era causa poco común en poblaciones diferentes a la mexicana, Sin embargo, actualmente existen reportes de

SCA 10 en pacientes de Brasil con fenotipos diferentes a los reportados en México donde resalta la ausencia de epilepsia en un primer reporte¹ y en un segundo estudio reportan en el 3.75% de 80 pacientes con SCA10¹⁰. Se han reportado también en una familia de Perú, la cual presentó crisis parciales complejas¹⁴, de igual manera se ha reportado en Argentina, Venezuela, Bolivia; así, como en países asiáticos como China y Japón.^{15, 16} En México es la segunda ataxia hereditaria más común y corresponde al 14.7% de todas las ataxias en México, después de SCA2 (45%).^{1,2}

2.4 Repeticiones cortas en tándem

Las repeticiones cortas en tándem (*Short tandem repeats*, “por sus siglas en inglés, STR”) o microsatélites, son secuencias repetidas de 1 a 6 pares de bases y en promedio se produce un STR por cada 2000 pares de bases en el genoma humano. Estas secuencias se encuentran en procariotas y eucariotas, incluidos los humanos. La mayoría de las STR se encuentran en regiones no codificantes y solo alrededor del 8% se encuentran en regiones codificantes, comprendiendo aproximadamente el 3% del genoma humano.^{17, 18} Las STR son algunos de los elementos genómicos que contribuyen a la variación genética humana, ya que sus secuencias repetidas dan lugar a mutaciones frecuentes que resultan principalmente en cambios en el número de copias repetidas. Además, comparadas con las mutaciones puntuales, las STR tienen entre 100 a 10 000 veces mayor índice de mutación¹⁸

Las mutaciones que dan lugar a una pequeña variación en el número de copias repetidas, pueden llegar a tener efectos fenotípicos escasos o nulos; contrario a esto, las mutaciones que terminan en expansiones más grandes son raras, sin embargo, son más inestables y pueden tener efectos fenotípicos graves, como la enfermedad de Huntington, el síndrome de cromosoma X frágil o las ataxias hereditarias.¹⁹ Existen varios mecanismos responsables de las alteraciones en la longitud de las STR, ya sea por recombinación homóloga, durante el mecanismo de reparación de ADN dañado o por entrecruzamiento desigual durante la meiosis. Sin embargo, el mecanismo principal es a través de un “deslizamiento de la hebra”, donde la desalineación de las hebras forma un bucle en la cadena molde, lo que conlleva a la expansión o contracción de la cadena de DNA recién sintetizada.¹⁹

El deslizamiento puede generar mutaciones tanto en la línea germinal, como en las células somáticas, durante la mitosis, y este puede ocurrir durante la replicación, donde las STR con secuencias ricas en GC, forman cuádruples de guanina (G4), lo que impide que la polimerasa continúe con la replicación del ADN. El deslizamiento también puede formarse durante la transcripción, donde se forman bucles R (Híbrido de ADN-ARN), los cuales dan lugar a expansiones de secuencias repetidas.¹⁹

Las pruebas genéticas moleculares utilizadas para analizar cada STR tienen un grado de complejidad mayor que las empleadas para analizar secuencias no expandidas en el genoma, ya que las secuencias repetidas no se alinean de forma única, impidiendo determinar su longitud y por ende se limita la determinación de la patogenicidad de la secuencia repetida; es por ello que la PCR convencional presenta dificultades en la detección de los nucleótidos expandidos y se precisan de técnicas más específicas como Southern Blot y la PCR- triple primer (TP-PCR, por sus siglas en inglés).²⁰ Además, es posible realizar análisis de fragmentos mediante la electroforesis capilar, la cual permite determinar el número de repetidos que corresponden a los individuos con alelo normal y los que portan la premutación o el alelo mutado, esta especificidad es muy importante en algunas enfermedades como la SCA10, en la cual, la diferencia de una sola repetición es de gran importancia para el correcto diagnóstico.²¹

2.5 ATXN10

El gen *ATXN10* (OMIM 611150) asociado a la enfermedad autosómica dominante “SCA10”, se encuentra en el cromosoma 22q13.31 y codifica para una proteína de 475 kDa de función indeterminada.^{1, 3} El producto de *ATXN10*, “Ataxina-10”, predomina en el citoplasma y estudios sugieren que tiene función en la supervivencia y diferenciación neuronal. Además, se ha reportado que el posible mecanismo patogénico asociado con SCA10, involucra niveles reducidos de expresión de la proteína “Ataxina-10” en neuronas sensoriales y tractos del cerebelo, sin embargo, es preciso el desarrollo de nuevos estudios que permitan esclarecer la función exacta de Ataxina-10 en células neuronales.^{11, 22}

El gen ATXN10 abarca 172.8 kb de ADN genómico y consta de 12 exones.³ La mutación que induce el desarrollo de SCA10, se encuentra en el intrón 9 del gen mencionado (Figura 1), esta representa una expansión de microsatélites, formada por la repetición del pentanucleótido ATTCT. Las repeticiones ATTCT son polimórficas y el rango de repeticiones varía: de 10-22 para el alelo normal, de 850-4500 para el alelo patogénico y de 280-850 repeticiones para alelos de longitud intermedia, cuya penetrancia observada es reducida.^{23, 24}

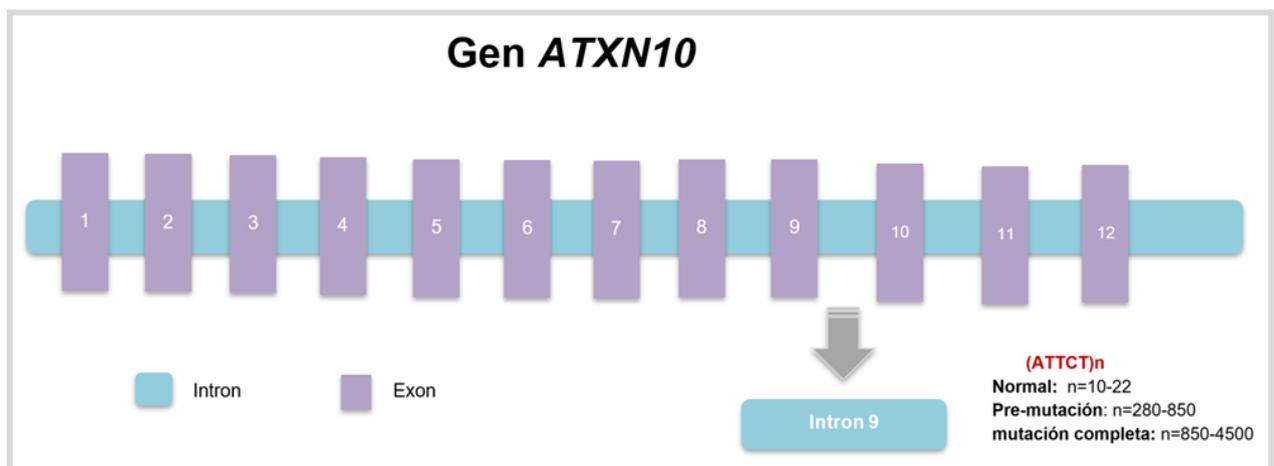


Figura 1. Estructura del gen ATXN. Se presentan los 12 exones (morado) y los intrones (azul) constituyentes del gen. El intrón 9 es la región donde se forman los expandidos (ATTCT)_n, donde n se refiere al número de repeticiones. Un alelo normal tiene de 10-22 repetidos, el alelo intermedio tiene de 280 a 850 repeticiones y el alelo mutado tiene de 850 a 4500 repetidos.²⁴

2.6 Variante rs41524547.

La ataxia espinocerebelosa tipo 10, afecta principalmente a la población de América Latina (LA) de ascendencia nativa americana. Las familias de Latinoamérica y del Este de Asia (EA) comparten un haplotipo ancestral, que incluye el alelo G con una frecuencia alélica de 2-4% en poblaciones de LA y EA; dicho alelo presenta una frecuencia del 0% en cualquier otra población.³

El haplotipo ancestral representa un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) “rs41524547 (C>G)”. Este polimorfismo está vinculado con los expandidos de SCA10, ya que, pese a estar separados por aproximadamente 35 kb, se considera que es una distancia suficiente para que ocurran eventos de recombinación dentro

de los 15,000-20,000 años desde la migración desde Asia a las Américas. En estudios recientes se ha observado que entre el 0 al 25% de personas con el alelo G, presentan también las expansiones de los repetidos de SCA10; estas características sugieren que este SNP (rs41524547) tiene un papel funcional sobre los expandidos de SCA10.^{4, 25}

2.7 Diagnóstico molecular de SCA10

Los diagnósticos moleculares, se refieren a las diversas técnicas utilizadas para la identificación de las bases moleculares de una enfermedad genética, este término es ampliamente utilizado en genética clínica y tiene como fin la detección de variantes genómicas para facilitar un diagnóstico preciso, el pronóstico y el seguimiento de la respuesta a la terapia.²⁶ El diagnóstico molecular para SCA10 precisa de la identificación de la expansión de los repetidos de ATTCT, esto puede realizarse mediante pruebas de un solo gen (TP-PCR y Southern Blot) o mediante paneles multigénicos (análisis de secuencia, análisis de delección/duplicación y otras pruebas no basadas en secuenciación).²⁷ En los últimos años, la secuenciación de segunda generación (NGS) se ha mostrado muy prometedora ya que existen “paneles de ataxia” que utilizan tecnología de secuenciación masiva paralela, sin embargo, la NGS aún no es lo suficientemente confiable y precisa para identificar las expansiones de nucleótidos.²⁷ Actualmente, las técnicas mencionadas requieren de mucho tiempo y tienen un costo elevado, lo que limita que muchos de los pacientes reciban un diagnóstico genético confirmatorio y por ende esto dificulta predecir la progresión de la enfermedad, dar un asesoramiento genético eficaz e identificar posibles terapias novedosas.

2.8 Biomarcadores

Un biomarcador se define como *“una característica definida que funciona como un indicador de procesos biológicos normales o patogénicos y de respuestas a una exposición o intervención”*.^{5 28} Los biomarcadores, tienen gran importancia como predictivos en el diagnóstico, el pronóstico y en la orientación terapéutica de enfermedades; además, estos tienen la ventaja de ser más simples, requieren tiempos más cortos y son menos costosos, sin embargo, aún se están desarrollando y refinando.²⁸

Hoy en día, con el avance de la biología molecular y la genética se ha logrado tener un mayor conocimiento de los genes y las mutaciones asociadas a enfermedades genéticas; los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), están implicados en la diversidad del genoma humano, estos pueden estar o no asociados a alguna enfermedad, sin embargo, algunos polimorfismos no están relacionados directamente con alguna enfermedad y en ocasiones se localizan cerca de mutaciones o polimorfismos involucrados en procesos patógenicos, lo que les confiere especial interés como marcadores genéticos.²⁹

2.9 Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (PCR-RFLP)

Existen diversas técnicas que permiten la detección de polimorfismos causados por el cambio de una base nitrogenada, la más directa es mediante secuenciación, sin embargo, esta es costosa, requiere mayor tiempo y debido a su complejidad se emplean otras técnicas más simples y rápidas, como la reacción en cadena de la polimerasa seguida por la digestión con enzimas de restricción (en inglés, PCR-RFLP).^{29, 30} La PCR se emplea para amplificar cantidades muy pequeñas de una secuencia de ADN de interés y los RFLP permiten que los SNP individuales puedan diferenciarse mediante el análisis de fragmentos derivados de la escisión de su ADN amplificado. Esta técnica precisa que las muestras de ADN sean cortadas en fragmentos de diferente tamaño mediante enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se separan según su longitud mediante electroforesis en gel de agarosa.³⁰

2.10 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas de restricción, reconocen una secuencia específica de nucleótidos en la doble cadena de ADN, dicha secuencia se conoce como sitio de restricción en donde la enzima corta y genera fragmentos de diferente tamaño.³¹ Estas se clasifican en los tipos I, II y III, según su estructura, longitud, simetría de las secuencias de reconocimiento y posición de escisión; Las enzimas de clase II son las más empleadas en ingeniería genética, ya que cortan las dos hebras de ADN en puntos muy específicos dentro del sitio de reconocimiento.³²

Un ejemplo de endonucleasas de tipo II, es la enzima "Acil", la cual ha sido aislada de *Arthrobacter citreus*; esta enzima reconoce una secuencia no palindrómica y corta entre las dos citocinas en la cadena 5'...3' y escinde entre la citocina y la guanina en la cadena 3'...5' (Figura 2).³³

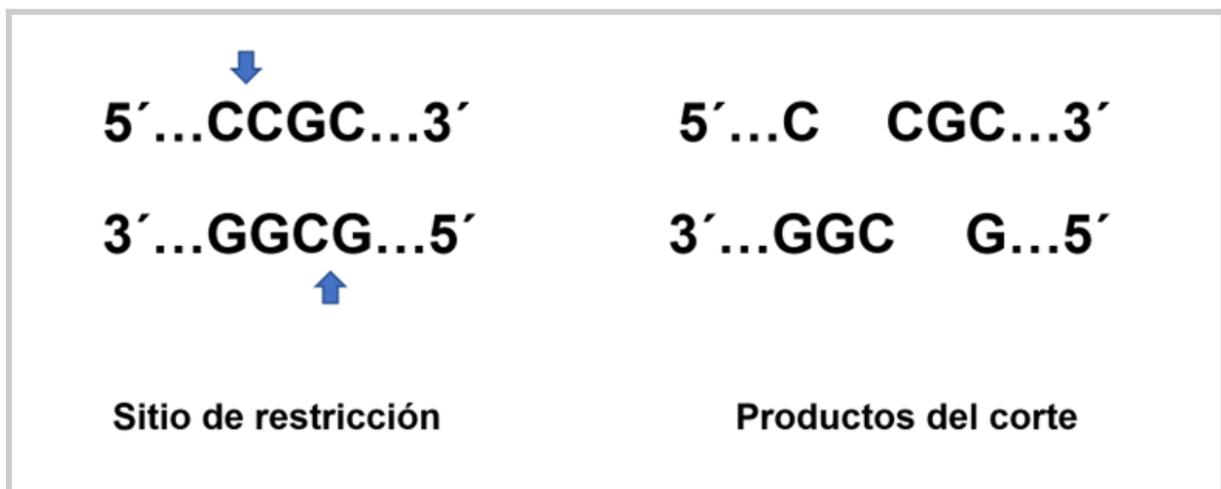


Figura 2. Sitio de restricción de Acil y producto del corte. Señalado con flechas (izquierda), se observa la secuencia no palindrómica donde corta la enzima y los fragmentos generados por el corte de la enzima (derecha) ³³

3. Justificación

En México, la ataxia espinocerebelosa tipo 10 representa el segundo tipo más común de ataxias espinocerebelosas de herencia autosómica dominante, presente en un 14.7% de la población. La SCA 10 está subdiagnosticada en México debido a la dificultad para su diagnóstico, así como la homogeneidad de signos y síntomas entre las diferentes ataxias, por lo cual, es necesario tener un biomarcador que nos permita identificar a los probables pacientes con SCA 10. Dentro de las limitaciones en los diagnósticos moleculares para SCA10 están, el costo elevado, periodos de tiempo largos y la complejidad de las técnicas, por lo que es necesario recurrir a técnicas más simples y costeables que permitan a las personas tener un diagnóstico preciso. Por ello, en la presente investigación se realizará un tamizaje mediante la PCR-RFLP para la posible identificación de portadores de la mutación de SCA10.

Hasta el día de hoy, uno de los mayores retos de la medicina es identificar y prevenir el riesgo de desarrollar una enfermedad en una persona sana o estimar la evolución de un padecimiento en un paciente concreto, esto ha despertado interés en el uso de biomarcadores que puedan ser útiles en el diagnóstico predictivo de eventos patológicos. El polimorfismo rs41524547 (C>G) en el intrón 9 del gen *ATXN10*, si bien no se ha reportado como una variante patogénica relacionada con SCA10, su cercanía con los expandidos de los microsatélites de ATTCT sugieren que este SNP pudiera tener un papel como biomarcador para el diagnóstico de SCA10.

4. Objetivos

Objetivo general

Implementar la técnica PCR-RFLP para la identificación de la variante rs41524547 (C/G) en el gen *ATXN10* usado como un biomarcador como tamizaje previo para el diagnóstico molecular de SCA10 en pacientes mexicanos.

Objetivos específicos

- Obtención de muestras de DNA de pacientes con diagnóstico de SCA 10 mediante Southern Blot y/o análisis de fragmentos.
- Estandarización de la técnica PCR-RFLP
- Detectar la presencia de la variante rs41524547 mediante la técnica de PCR-RFLP y electroforesis en gel de agarosa, en pacientes mexicanos con SCA10
- Determinar el porcentaje de pacientes con el Alelo G

5. Materiales y métodos

Diseño: estudio de tipo transversal para describir la distribución alélica.

Población de estudio: Las muestras empleadas se obtuvieron del banco de DNA del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” (INNN-MVS). Se seleccionaron muestras de ADN de pacientes con SCA10 con diagnóstico molecular mediante análisis de fragmentos o Southern Blot, esto con la finalidad de corroborar si el alelo G segrega con la mutación del expandido ATTCT de SCA10.

Materiales

Los materiales necesarios para llevar a cabo las técnicas empleadas en la presente investigación se describen a continuación, en la Tabla 1.

Material	Reactivos	Equipos
Agarosa	Agua destilada	Termociclador
Micropipetas	Buffer TBE	Cámara de electroforesis
Puntas	Buffer 10X	Transiluminador
Papel Parafilm	Enzima Acil	Espectrofotómetro
Microtubos	Templado de DNA	Vortex
Gradilla de plástico	Primer forward	Microcentrífuga
Guantes de látex	Primer reverse	Fuente de poder
Bata de laboratorio	AmpliTaq Gol 360 máster mix	
Cubrebocas	Enhancer	

Tabla 1. Materiales. Se describe el material, reactivos y equipos utilizados durante esta investigación

Procedimiento general

La presente investigación fue aprobada por los comités de investigación y bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN) ubicado en la ciudad de México. En la Figura 3, se muestra el procedimiento general de los procesos llevados a cabo en este trabajo y posteriormente se describirán a detalle.

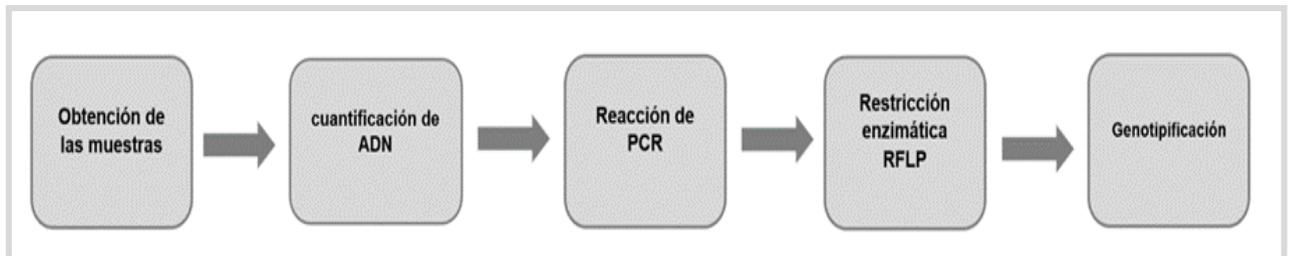


Figura 3. Procedimiento general, se resumen las etapas experimentales de la presente investigación. Se muestran en orden de ejecución de izquierda a derecha.

Descripción de los procedimientos

I. Preparación de las muestras y cuantificación de DNA

Las muestras provenientes del banco de DNA del INNN, fueron cuantificadas mediante espectrofotometría de luz visible, para lo cual se utilizaron 3uL de cada muestra para medir la concentración y obtener el valor obtenido de la relación de absorbancia 260/280 (Longitud de onda de máxima absorción de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente); posteriormente se realizaron diluciones para obtener una concentración de DNA final de 50 ng/uL en un volumen final de 50 uL.

II. Amplificación por PCR

Las muestras de ADN diluidas para amplificar la secuencia diana de interés (Figura 4), se prepararon de acuerdo a las condiciones descritas en la Tabla 1.



Figura 4. Fragmento de la secuencia del gen de la ATXN10, donde se muestra la region a amplificar, flanqueado por los primer forward (amarillo) y primer reverse (verde). Se encuentra el marcador de estudio en color rojo.

Se preparó la mezcla de reacción de PCR de acuerdo a la Tabla 2, para posteriormente realizar la PCR, siguiendo las condiciones de reacción descritas en la Tabla 3.

Reactivos	Cantidad por reacción
Templado gDNA	200 ng/uL
AmpliTaq Gol 360 máster mix	10 uL
Primer forward	1.5 uL
Primer Reverse	1.5 uL
Enhancer	1.3 uL
Agua destilada	6 uL

Tabla 2. Reacción de PCR. Componentes y volúmenes usados en la reacción de PCR

Desnaturalización inicial	95 °C	6 s	30 ciclos
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Alineamiento	55 °C	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión final	72 °C	30 s	
Conservación	12 °C	∞	

Tabla 3. Condiciones de reacción de PCR. Se describen las temperaturas, el tiempo y el número de ciclos durante cada etapa de la reacción de PCR

III. Restricción enzimática por RFLP

De los productos amplificados a partir de la PCR, se tomaron 10 uL para restricción enzimática durante una hora a 37°C en un termociclador, siguiendo las siguientes condiciones de reacción descritas en la Tabla 4.

Producto de PCR	10 uL	1 hora a 37 °C
Enzima Acil	0.5 uL	
Buffer 10X	2.5 uL	
Agua destilada	7 uL	

Tabla 4. Restricción enzimática, se muestran los componentes y volúmenes utilizados para la digestión enzimática de los amplicones obtenidos. La digestión se realizó durante una hora a una temperatura de 37°C

IV. Electroforesis en gel de agarosa

De las muestras digeridas con la enzima Acil (*NEB*), se mezcló toda la muestra con 15 uL de colorante de carga y gel red para su visualización, se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% y se corrieron en la cámara de electroforesis a 100 voltios durante 2 horas. Finalmente, el gel se expuso a la luz ultravioleta (UV) en el transiluminador, lo que permitió la visualización de las bandas y así poder determinar el genotipo presente en cada muestra estudiada.

V. Genotipificación

La presencia de 3 fragmentos derivados de la acción de corte de la enzima Acil corresponden a los pacientes con la variante rs41524547, es decir, aquellos con el genotipo C/G, además, cuando la enzima Acil no hace corte en el fragmento de DNA amplificado, se puede visualizar 1 fragmento correspondiente al genotipo C/C, también se pueden formar dos fragmentos cuando la enzima corta en ambos alelos materno y paterno y lo cual corresponde al genotipo G/G. En la Figura 5, se muestra

cómo se verían los genotipos en el gel de electroforesis después de la restricción enzimática.

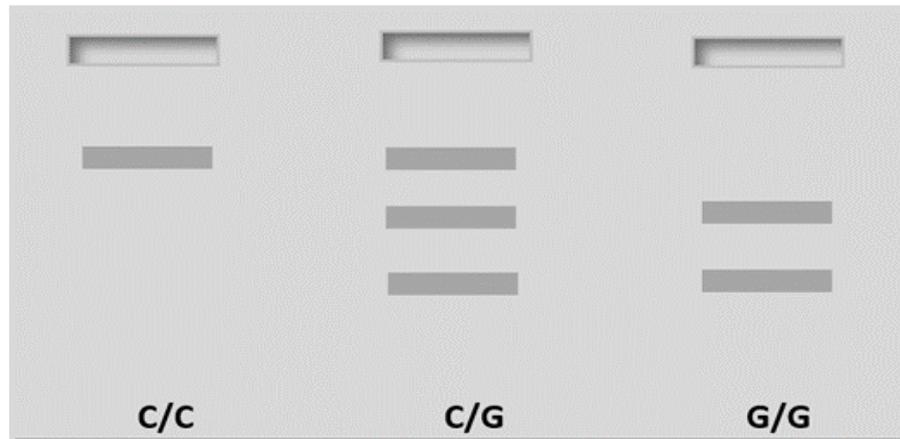


Figura 5. Genotipo en gel de electroforesis. Se observa el gel bajo la luz UV, la presencia de una banda corresponde al genotipo C/C, mientras que tres bandas corresponden al genotipo C/G y finalmente, se observan dos bandas para el genotipo G/G

6. Resultados

Las muestras incluidas en este estudio corresponden a 39 pacientes, de los cuales, 22 pacientes eran hombres y 16 eran mujeres (Tabla 5). La población de estudio final tiene una media de edad de 38.6 años y presentaba signos aparentes de leves a graves de ataxia cerebelosa, los cuales obtuvieron un diagnóstico molecular de ataxia espinocerebelosa de tipo 10 dentro de las instalaciones del INNN mediante análisis de fragmentos o Southern Blot.

Muestra	Edad	Sexo	Genotipo RFLP'S
1	50	M	C/G
2	31	F	C/C
3	48	F	C/G
4	30	F	C/G
5	21	F	C/G
6	54	M	C/G
7	55	M	C/C
8	29	-----	C/G
9	33	F	C/C
10	50	M	C/G
11	58	F	C/G
12	22	M	C/G
13	44	M	C/G
14	48	F	C/C
15	27	M	C/G
16	21	M	C/C

17	43	M	C/G
18	30	M	C/G
19	35	F	C/G
20	42	M	C/C
21	34	M	C/G
22	49	M	C/G
23	43	M	C/G
24	30	M	C/G
25	42	M	C/C
26	33	F	C/G
27	37	F	C/G
28	38	M	C/G
29	53	F	C/G
30	38	F	C/G
31	48	M	C/G
32	31	F	C/G
33	48	F	C/G
34	41	F	C/G
35	45	F	C/C
36	35	M	C/G
37	20	M	C/G
38	60	M	C/G
39	10	M	C/G

Tabla 5. Resultados de la genotipificación. Se enlistan las edades, sexo y el genotipo obtenido para cada una de las muestras de estudio.

Del total de las muestras, se observó que el 21% de los pacientes correspondieron al genotipo C/C, mientras que el 79% corresponde al genotipo C/G (Figura 6).

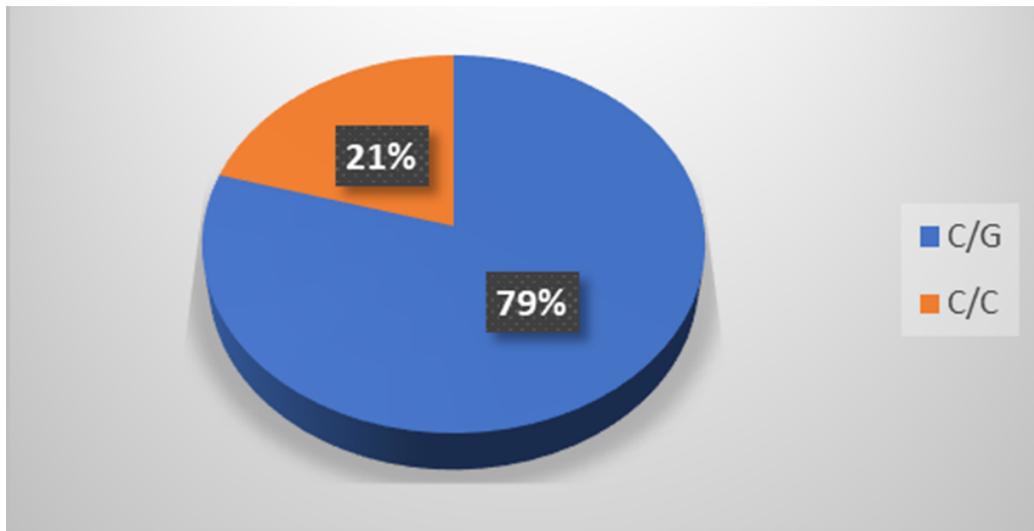


Figura 6. Porcentaje de genotipos C/C y C/G. Se observó el genotipo C/G en el 21% de las muestras totales, mientras que el 79% tiene el genotipo C/C

El 82% de los sujetos hombres presentó el genotipo C/G con la variante y el 18% restante mostró el genotipo C/C; en el caso de las mujeres, se observó la presencia del genotipo C/G en el 75% del total y el 25% corresponde al alelo C (Figura 7).

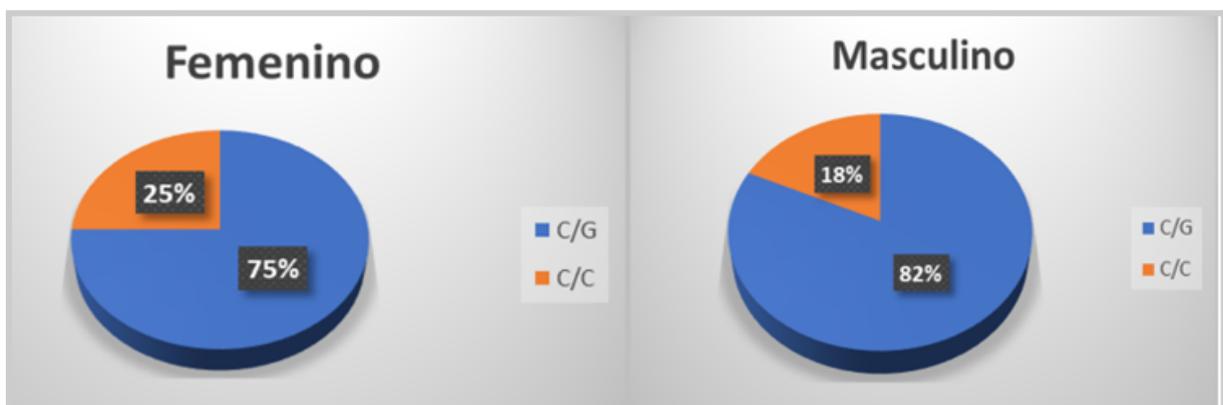


Figura 7. Genotipos en hombres y mujeres. Se describen los porcentajes para genotipos C/C y C/G en mujeres (izquierda) y hombre (derecha).

7. Discusión

La ataxia espinocerebelosa de tipo 10 es una de las SCA más comunes en México, si bien, los primeros indicios de esta enfermedad provinieron de familias de origen mexicano, tiempo después se identificó en familias brasileñas con origen portugués y amerindio y recientemente se tienen reportes en una familia argentina con origen español y amerindio. La ausencia de SCA10 en varias poblaciones de Europa y su aparición común en América Latina respalda la teoría de un posible efecto fundador para este tipo de ataxia.³⁴ En los últimos años, la explicación del origen ancestral de la expansión de SCA10 y un posible efecto fundador han sido de importancia, ya que, podría ayudar a explicar la frecuencia de SCA10 en América Latina. Se ha reportado la presencia del alelo G (rs41524547) en familias con SCA10 de América Latina y del Este de Asia con una frecuencia alélica de 2-4%. Actualmente, en Texas y Brasil se lleva a cabo una investigación a cargo del Instituto Nacional de Enfermedades Neurológicas, donde se estudian muestras de ADN con el alelo G de la variante rs41524547 y de donde se ha encontrado que el 25% de las muestras con presencia de la variante, tienen las expansiones repetidas de SCA10.⁴ En la presente investigación se observó que el 79% de la población de estudio presentaba un genotipo C/G con el diagnóstico molecular previo de SCA10, sin embargo, será necesario aumentar el número de población para poder tener un resultado más certero y con menor margen de error, ya que, con algunas de las muestras con las que se trabajó, se observó un alelo normal "C" aun cuando el diagnóstico era confirmatorio para los expandidos de SCA10 mediante análisis de fragmentos y Southern Blot, por lo que, si esta técnica se implementará tendríamos un 21% de pacientes portadores de la mutación, de los cuales el 25% de las mujeres y el 18% de los hombres no entrarían en el diagnóstico molecular.

Para que un biomarcador sea clínicamente útil, debe tener una alta precisión predictiva, debe ser fácilmente medible y reproducible, además, deben emplearse técnicas mínimamente invasivas y accesibles para el paciente y el personal de la salud.³⁵ La evaluación de los biomarcadores empleados en el diagnóstico predictivo o confirmatorio de enfermedades, se realiza frente a un diagnóstico de referencia para calcular la sensibilidad (fracción de personas con la enfermedad que dan positivo) y la especificidad (fracción de personas sin la enfermedad que dan

negativo), lo ideal para un biomarcador sería un 100% tanto de sensibilidad como de especificidad, sin embargo, en la práctica, no se ha observado un rendimiento perfecto, pero siempre es necesario buscar lo más cercano al 100%, de esta forma una vez validado un biomarcador se puede utilizar para evaluar el riesgo de enfermedad en una población general, detectar o confirmar el diagnóstico de enfermedad en un paciente individual y adaptar el tratamiento de un individuo.³⁶

8. Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, se cumplió con el desarrollo de la técnica de PCR-RFLP y por ende se logró determinar la presencia de la variante rs41524547. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten utilizar el SNP como biomarcador de SCA10, ya que, un porcentaje considerable de pacientes no podría tener un diagnóstico molecular confirmatorio del expandido mediante otra técnica. Por lo que, en caso de que se hagan investigaciones futuras para identificar biomarcadores, será necesario trabajar con un mayor número de muestras para una optimización de la técnica, que permita realizar un escaneo de los pacientes con probable diagnóstico de SCA10 que los vuelvan candidatos a realizarles el diagnóstico molecular.

Referencias bibliográficas

1. Domingues, B., Nascimento, F. A., Meira, A. T., Moro, A., Raskin, S., Ashizawa, T., & Teive, H. (2019). Clinical and Genetic Evaluation of Spinocerebellar Ataxia Type 10 in 16 Brazilian Families. *Cerebellum* (London, England), 18(5), 849–854. <https://doi.org/10.1007/s12311-019-01064-y>
2. Soong, B. W., & Morrison, P. J. (2018). Spinocerebellar ataxias. *Handbook of clinical neurology*, 155, 143–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00010-X>
3. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). (2019). ATAXIN 10; ATXN10. Consultado en Abril del 2022 de <https://www.omim.org/entry/611150>
4. Tetsuo Ashizawa. (2020). Genetic Mechanism of Conserved Ancestral Haplotype in SCA10 (CAHSCA10). The Methodist Hospital Research Institute. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04495426>
5. Califf R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 243(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
6. Bird TD. Hereditary Ataxia Overview. (1998 [Updated 2022 Jun 16]). In: Adam MP, Mirzaz GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>
7. Klockgether, T., & Paulson, H. (2011). Milestones in ataxia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26(6), 1134–1141. <https://doi.org/10.1002/mds.23559>
8. Akbar, U., & Ashizawa, T. (2015). Ataxia. *Neurologic clinics*, 33(1), 225–248. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.09.004>
9. Salman M. S. (2018). Epidemiology of Cerebellar Diseases and Therapeutic Approaches. *Cerebellum* (London, England), 17(1), 4–11. <https://doi.org/10.1007/s12311-017-0885-2>
10. Teive, H. A., Munhoz, R. P., Arruda, W. O., Raskin, S., Werneck, L. C., & Ashizawa, T. (2011). Spinocerebellar ataxia type 10 - A review. & related disorders, 17(9), 655–661. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.04.001>
11. Sullivan, R., Yau, W. Y., O'Connor, E., & Hould Parkinsonism, H. (2019). Spinocerebellar ataxia: an update. *Journal of neurology*, 266(2), 533–544. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9076-4>
12. Bampi, G. B., Bisso-Machado, R., Hünemeier, T., Gheno, T. C., Furtado, G. V., Veliz-Otani, D., Cornejo-Olivas, M., Mazzeti, P., Bortolini, M. C., Jardim, L. B., Saraiva-Pereira, M. L., & Rede Neurogenética (2017). Haplotype Study in SCA10 Families Provides Further Evidence for a Common Ancestral Origin of the Mutation. *Neuromolecular medicine*, 19(4), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8464-8>
13. Teive, H. A., Roa, B. B., Raskin, S., Fang, P., Arruda, W. O., Neto, Y. C., Gao, R., Werneck, L. C., & Ashizawa, T. (2004). Clinical phenotype of Brazilian families with spinocerebellar ataxia 10. *Neurology*, 63(8), 1509–1512. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000142109.62056.57>
14. Leonardi, L., Marcotulli, C., McFarland, K. N., Tessa, A., DiFabio, R., Santorelli, F. M., Pierelli, F., Ashizawa, T., & Casali, C. (2014). Spinocerebellar ataxia type 10 in Peru: the missing link in the Amerindian origin of the disease. *Journal of neurology*, 261(9), 1691–1694. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7394-8>
15. Wang, K., McFarland, K. N., Liu, J., Zeng, D., Landrian, I., Xia, G., Hao, Y., Jin, M., Mulligan, C. J., Gu, W., & Ashizawa, T. (2015). Spinocerebellar ataxia type 10 in Chinese Han. *Neurology. Genetics*, 1(3), e26. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000026>

16. Naito, H., Takahashi, T., Kamada, M., Morino, H., Yoshino, H., Hattori, N., Maruyama, H., Kawakami, H., & Matsumoto, M. (2017). First report of a Japanese family with spinocerebellar ataxia type 10: The second report from Asia after a report from China. *PLoS one*, 12(5), e0177955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177955>
17. Gymrek M. (2017). A genomic view of short tandem repeats. *Current opinion in genetics & development*, 44, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.01.012>
18. Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. (2007). *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 5(1):7-14. doi: 10.1016/S1672-0229(07)60009-6. PMID: 17572359; PMCID: PMC5054066.
19. Verbiest, M., Maksimov, M., Jin, Y., Anisimova, M., Gymrek, M., & Bilgin Sonay, T. (2023). Mutation and selection processes regulating short tandem repeats give rise to genetic and phenotypic diversity across species. *Journal of Evolutionary Biology*, 36, 321– 336. <https://doi.org/10.1111/jeb.14106>
20. Wallace SE, Bird TD. (2018). Molecular genetic testing for hereditary ataxia: What every neurologist should know. *Neurol Clin Pract*. 8(1):27-32. doi: 10.1212/CPJ.0000000000000421.
21. Magaña, Jonathan J, Arenas-Sordo, María de la Luz, & Gómez, Rocío. (2009). La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista médica de Chile*, 137(7), 946-956. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000700014>
22. Santos, L. R., Teive, H., Lopes Neto, F., Macedo, A., Mello, N. M., & Zonta, M. B. (2018). Quality of life in individuals with spinocerebellar ataxia type 10: a preliminary study. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 76(8), 527–533. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20180077>
23. Gheno, T. C., Furtado, G. V., Saute, J., Donis, K. C., Fontanari, A., Emmel, V. E., Pedroso, J. L., Barsottini, O., Godeiro-Junior, C., van der Linden, H., Ternes Pereira, E., Cintra, V. P., Marques, W., Jr, de Castilhos, R. M., Alonso, I., Sequeiros, J., Cornejo-Olivas, M., Mazzetti, P., Leotti, V. B., Jardim, L. B., ... Rede Neurogenetica (2017). Spinocerebellar ataxia type 10: common haplotype and disease progression rate in Peru and Brazil. *European journal of neurology*, 24(7), 892–e36. <https://doi.org/10.1111/ene.13281>
24. Guo, P., & Lam, S.L. (2020). Minidumbbell structures formed by ATTCT pentanucleotide repeats in spinocerebellar ataxia type 10. *Nucleic Acids Research*, 48, 7557 - 7568.
25. National Institutes of Health (NIH). (2022). rs41524547. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs41524547#frequency_tabs4
26. Patrinos, G.; Danielson, p.; Ansorge, w. 2017. Chapter 1 – Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future. Third Edition. Academic Press. Pages 1-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00001-8>.
27. Matsuura T, Ashizawa T. Spinocerebellar Ataxia Type 10. (2002 [Updated 2019 Sep 19]). In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1175/>
28. Novelli G, Ciccacci C, Borgiani P, Papaluca Amati M, Abadie E. (2008). Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 5(2):149-54. PMID: 22460999; PMCID: PMC2781197
29. Torres, Sandra. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *OFFARM*. 21 (5). [https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-diversidad-del-genoma-humano-polimorfismos13031745#:~:text=En%20t%C3%A9rminos%20cient%C3%ADficos%2C%20el%20polimorfismo,\(locus\)%20en%20un%20cromosoma](https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-diversidad-del-genoma-humano-polimorfismos13031745#:~:text=En%20t%C3%A9rminos%20cient%C3%ADficos%2C%20el%20polimorfismo,(locus)%20en%20un%20cromosoma)

30. Dai, S., & Long, Y. (2015). Genotyping analysis using an RFLP assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1245, 91–99. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_7
31. Zerbini, F. M., Silva, F. N. D., Urquiza, G. P. C., & Basso, M. F. (2014). Transgenic Plants. *Biotechnology and Plant Breeding*, 179-199. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418672-9.00008-8>
32. Green, M. R., & Sambrook, J. (2021). Restriction Enzymes. *Cold Spring Harbor protocols*, 2021(4), 10.1101/pdb.top101360. <https://doi.org/10.1101/pdb.top101360>
33. Polisson C, Morgan RD. Acil, a unique restriction endonuclease from *Arthrobacter citreus* which recognizes 5' CCGC 3'. *Nucleic Acids Res.* 1990 Oct 11;18(19):5911. doi: 10.1093/nar/18.19.5911.
34. Almeida, T., Alonso, I., Martins, S., Ramos, E. M., Azevedo, L., Ohno, K., Amorim, A., Saraiva-Pereira, M. L., Jardim, L. B., Matsuura, T., Sequeiros, J., & Silveira, I. (2009). Ancestral origin of the ATTCT repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10). *PloS one*, 4(2), e4553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004553>
35. Chen, X. H., Huang, S., & Kerr, D. (2011). Biomarkers in clinical medicine. *IARC scientific publications*, (163), 303–322.
36. Food and Drug Administration (US). (2020, 16 noviembre). Diagnostic Biomarker. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402285/>