



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DEL ORIGEN COMÚN DE LA
EXPANSIÓN DEL TRINUCLEÓTIDO CAG EN EL GEN
ATXN7 PRESENTE EN LA POBLACIÓN MEXICANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MALDONADO RODRÍGUEZ MARICRUZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

PRESIDENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri
VOCAL: Profesor: María Benita Leonor Fernández Salgado
SECRETARIO: Profesor: Jonathan Javier Magaña Aguirre
1er. SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova
2do. SUPLENTE: Profesor: Laura Carmona Salazar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Medicina Genómica del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

Este trabajo fue financiado por el proyecto con registro PICS12-162 de la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal a cargo del Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre.

ASESOR

Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre

SUSTENTANTE

Maricruz Maldonado Rodríguez

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de disfrutar todo lo que tengo en la vida, por darme a la mejor familia.

A mis padres, gracias Laura y Ángel por sus esfuerzos, por su comprensión y sobre todo gracias por el amor que siempre me han brindado. Gracias por enseñarnos a luchar ante la vida, a darnos principios y valores, los amo.

A Ricardo gracias por ser mi guía, por todos los años que me cuidaste, te quiero y te admiro mucho.

A Eugenia porque eres una gran mujer, gracias por ser mi compañía y porque siempre me ayudas en todo. A ti mi grande y guapo sobrino por todo lo que nos hemos divertido, a mi cuñado Julio por apoyarme.

A ti Fernando, mi héroe, por ser la luz de mi vida, porque hemos cumplido aquella promesa que hicimos hace varios años atrás, porque siempre estás a mi lado. Gracias por tu apoyo incondicional, no cabe duda que sin él, el camino sería aún más largo. Te amo

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque es un orgullo ser egresada de la máxima casa de estudios, especialmente a la Facultad de Química por todas las vivencias y enseñanzas brindadas a lo largo de la carrera.

A mi tutor el Dr. Jonathan Magaña por darme la oportunidad de ser parte de su gran equipo de trabajo, por el asesoramiento al realizar esta tesis.

A la Dra. Rocío Gómez, por todas las experiencias y enseñanzas compartidas, por su gran apoyo a lo largo de este camino y gracias por ser como una amiga admirable para mí.

A aquellas personitas que ya no están físicamente conmigo, y aquellas personas que empiezan a formar parte de mi familia en especial a Dani, Sr. Marcos y Sra. Lupita

Contenido

1. Resumen	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Ataxias	2
2.1.1 Ataxias autosómicas dominantes.....	3
2.2 Mutaciones genéticas asociadas a ataxias espinocerebelosas	4
2.2.1 Expansión anormal de repetidos trinucleótidos	5
2.2.2 Mecanismos de inestabilidad genética	7
2.3 Genética y patofisiología de las SCAs poliglutamínicas	9
2.3.1 Epidemiología de las SCAs poliglutamínicas	11
2.3.2 Panorama de las SCAs en México	11
2.4 Ataxia espinocerebelosa tipo 7.....	13
2.4.1 Ataxina 7	14
2.4.2 Patogénesis de SCA7.....	15
2.12 Origen de la SCA7: Efecto fundador	18
2.5 Marcadores moleculares	20
2.5.1 Marcadores genéticos para el estudio de ligamiento con SCA7	22
2.6 Genética de poblaciones	24
3. Planteamiento del problema	26
4. Justificación	26
5. Hipótesis	27
6. Objetivos	27
7. Metodología.....	28
7.1 Individuos de estudios	28
7.1.1 Portadores de la mutación SCA7	28
7.1.2 Grupos control	28
7.1.3 Familiares sanos de los portadores de SCA 7	29
7.1.4 Población sana mestizo mexicana	29
7.2 Determinación de variables operativas	29

7.2.1 Extracción de ADN	29
7.2.2 Cuantificación de ADN	31
7.2.3 Diagnóstico molecular de SCA7	31
7.3 Marcadores microsatélite ligados a la mutación de SCA7	31
7.3.1 Amplificación mediante PCR en punto final	31
7.3.2 Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis capilar	33
7.4 Análisis del marcador SNP ligado a la mutación de SCA7.....	34
7.5 Análisis estadístico.....	35
8. Resultados	36
8.1 Características generales de los individuos portadores de SCA7.....	36
8.2 Análisis de los marcadores microsatélites D3S1287, D3S1228 y D3S3635 a través de electroforesis capilar	37
8.3 Frecuencias alélicas para cada marcador microsatélite	39
8.4 Frecuencias genotípicas para cada marcador microsatélite	43
8.5 Frecuencias alélicas y genotípicas del marcador rs377429.....	48
8.6 Haplotipo común en los portadores con SCA7	49
8.7 Equilibrio de Hardy-Weinberg	52
9. Discusión	53
9.1 Efecto fundador.....	54
9.2 Haplotipo común para portadores de SCA7	56
9.3 Determinación del origen de la expansión parental	58
9.4 Análisis poblacional	59
9.5 Origen de la mutación	59
10. Conclusiones	60
11. Perspectivas	60
12. Referencias.....	61

Tablas

Tabla 1. Ataxias autosómicas dominantes	4
Tabla 2. Clasificación de los STRs de acuerdo a su longitud y tipo de secuencia.....	6
Tabla 3. Características de las SCAs poliglutamínicas	10
Tabla 4. Distribución de portadores con SCA y la tasa de prevalencia en el Estado de Veracruz. .	13
Tabla 5. Haplotipos de Familias de SCA7 de diferentes orígenes geográficos, usando los marcadores descritos en el texto	24
Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos.....	32
Tabla 7. Condiciones de la Amplificación por PCR punto final.....	32
Tabla 8. Condiciones utilizadas para el análisis de fragmentos	34
Tabla 9. Condiciones de la Amplificación por PCR tiempo real.....	35
Tabla 10. Frecuencia en porcentaje de los alelos obtenidos para el marcador D3S1287.....	39
Tabla 11. Frecuencia en porcentaje de los alelos obtenidos para el marcador D3S3635.....	40
Tabla 12. Frecuencia en porcentaje de los alelos obtenidos para el marcador D3S1228.....	41
Tabla 13. Frecuencia en porcentaje de los genotipos obtenidos para el marcador D3S1287.....	43
Tabla 14. Frecuencia en porcentaje de los genotipos obtenidos para el marcador D3S3635.....	44
Tabla 15. Frecuencia en porcentaje de los genotipos obtenidos para el marcador D3S1228.....	45
Tabla 16. Frecuencia en porcentaje de los alelos y genotipos para el polimorfismo rs377429.....	48
Tabla 17. Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo portador de SCA7 y los grupos controles.....	50
Tabla 18. Desequilibrio de Ligamiento	52
Tabla 19. Características de variabilidad genética por marcador polimórfico.	52

Figuras

Figura 1. Distintas expansiones anormales de repetidos causan un gran número de enfermedades neurológicas	6
---	---

Figura 2. Estructuras secundarias diferentes a la B-ADN	7
Figura 3. Mecanismo de replicación.....	8
Figura 4. Origen geográfico de los portadores con SCA2 y SCA7, dentro del estado de Veracruz	12
Figura 5. Representación gráfica de la familia Ataxina 7 en humanos y en levadura	14
Figura 6. Degeneración de las CP y la formación de agregados nucleares en otras células cerebelares	17
Figura 7. Incorporación de Ataxina 7 mutada dentro del complejo STAGA.	18
Figura 8. Localización genética de la región de SCA7	23
Figura 9. Condiciones de Temperatura de PCR	33
Figura 10. Condiciones de temperatura para la realización de la PCR en tiempo real	35
Figura 11. Distribución de los alelos presentes en los portadores con la mutación de SCA7	36
Figura 12. Secuencias de los marcadores microsatélites ligados a la expansión anormal de los repetidos CAG en el gen ATXN7	37
Figura 13. Electroferogramas para los marcadores D3S1287, D3S3635 y D3S1228.....	38
Figura 14. Distribución alélica obtenida para cada marcador microsatélite	42
Figura 15. Distribución genotípica obtenida para cada marcador microsatélite	47
Figura 16. Distribución alélica y genotípica del Polimorfismo rs3774298	49
Figura 17. Frecuencia en porcentaje del haplotipo A-254-98-82	51
Figura 18. Zona Geográfica de las diferentes comunidades con portadores de SCA7.....	54
Figura 19. Pedigrees de las familias con SCA7	55
Figura 20. Pedigree de la familia con el individuo de mayor número de repetidos	58

Abreviaciones

SCA	Ataxia espinocerebelosas
CAG	Citosina/Adenina/Guanina
FRDA	Ataxia de Friederich
FXTAS	Síndrome ataxia/temblor asociado a X-frágil
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NARP	Neuropatía con ataxia y retinitis pigmentosa
ADCA	Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes
<i>FGF14</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos 14
<i>TTBK-2</i>	Cinasa tau tubulina 2
STR	Repeticiones cortas en tandem
EH	Enfermedad de Huntington
DM	Distrofia miotónica
FEN1	Endonucleasa Flap
MMR	Reparación en el apareamiento erróneo
NER	Reparación por eliminación de nucleótidos
ARN	ácido ribonucleico
CP	Células de Purkinge
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SAGA	Spt/Ada/Gcn5 acetilasa
STAGA	SPT3-TAF9-ADA-GCN5 acetiltransferasa
SLN	Secuencias de localización nuclear
SEN	Secuencias de exportación nuclear
MT	Microtúbulos
LINE	Elementos nucleares largos intercalados
CNVs	Variación en el número de copias
VNTR	Repeticiones en tándem de número variable
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
A	Adenina
C	Citosina
T	Timina
G	Guanina
cM	centi Morgan
PCA	Probabilidad de coincidencia al azar
ML	Marco de lectura
Crx	Homeobox cono-bastón
$x g$	Multiplicador por la aceleración gravitacional terrestre (9.81 m/s*s)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio

1. Resumen

Las ataxias espinocerebelosas (SCAs) conforman un grupo de trastornos neurodegenerativos con una alta heterogeneidad clínica, genética y neuropatológica. Actualmente se han identificado más de 30 variedades de SCA debido a mutaciones en diversos genes. A lo largo del mundo se reporta que la SCA3 es la ataxia más común (21%), seguida por la SCA2 y SCA6 (15%) y lejanamente por SCA1 (6%) y SCA7 (5%). Sin embargo, recientemente se reportó en México una alta prevalencia de SCA7 en la región central del estado de Veracruz, lo que hace que sea la serie de casos más importantes de SCA7 a nivel mundial. La SCA7 es provocada por una expansión anormal de repetidos CAG en el tercer exón del gen *ATXN7* ubicado dentro del cromosoma 3. Se caracteriza por presentar ataxia cerebelosa que se acompaña de disfagia, disdiadococinesias, así como pérdida de la visión.

Debido a la alta frecuencia de SCA7 en el estado de Veracruz, es importante determinar si el problema es propio de esta región geográfica o puede estar generalizado a través de la República Mexicana. Para ello es necesario determinar si los casos de SCA7 en Veracruz presentan un origen común. Para encontrar un haplotipo común en los portadores de SCA7, se realizó la genotipificación de cuatro marcadores moleculares anteriormente reportados como ligados a la mutación de SCA7 (3145(G/A) / D3S1287 / D3S3635 / D3S1228). Este estudio incluyó a 71 portadores de SCA7 originarias de 4 comunidades del estado de Veracruz (Tlaltetela, Tuzamapan, Cosautlán y Xalapa), además de 300 individuos de la población sana mestiza mexicana, un grupo de 74 individuos no relacionados entre sí originarios de la región en estudio y 69 familiares sanos de los portadores con SCA7.

El haplotipo A-254-98-82 fue común para todos los portadores con SCA7, presentando diferencias estadísticamente significativas con los grupos controles analizados. Se determinó que este haplotipo se encuentra ligado con la mutación de SCA7 en nuestra población, lo que determina que todos los portadores de SCA7 presentan un origen común. Con ello, demostramos la presencia de un efecto fundador para SCA7 en la región central del estado de Veracruz, con lo que se puede determinar que dicho fenómeno es de origen local y no a nivel nacional.

2. Antecedentes

2.1 Ataxia

La palabra ataxia se refiere a un desorden neurológico manifestado histológicamente por una degeneración del cerebelo y de sus conexiones aferentes y eferentes. Clínicamente significa la pérdida del control en los movimientos corporales presentando una inestabilidad en la marcha, dificultades para hablar, respirar y deglutir. Esta degeneración puede ser clasificada en ataxias hereditarias, no hereditarias y/o adquiridas^{1,2,3}.

Las ataxias de tipo hereditario se consideran las de mayor importancia debido a su rápida evolución, se caracterizan por tener un desorden neurodegenerativo que causa afectaciones multisistémicas, y de acuerdo al patrón de herencia que presentan son subclasificadas como:

- i) Autosómicas dominantes
- ii) Autosómicas recesivas
- iii) Ligadas al cromosoma X
- iv) Mitocondriales.

Las ataxias autosómicas recesivas son un gran y complejo grupo de enfermedades causadas por mutaciones en diferentes genes que generalmente se presentan en una edad temprana. Dentro de este grupo, la Ataxia de Friederich (FRDA) y la ataxia telangiectasia son las más comunes a nivel mundial. Aunado a estas, se han descrito al menos 13 tipos más de ataxias con un patrón de herencia autosómico recesivo, sin embargo presentan una baja frecuencia en la población.⁴

Por otro lado el síndrome ataxia/temblor asociado a X-frágil (FXTAS) es una ataxia de evolución lenta que presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X, afectando a más hombres que a mujeres, es la causa más común de retraso mental en niños.⁵ También existen diversas mutaciones en el ADN mitocondrial que ocasionan ataxia, como por ejemplo mutaciones en genes que codifican para subunidades del complejo de la cadena respiratoria, como el síndrome NARP (neuropatía con ataxia y retinitis pigmentosa), pero son consideradas de muy baja prevalencia a nivel mundial.⁶

Por último, dentro de las ataxias dominantes encontramos a las ataxias episódicas caracterizadas por lances discretos, recurrentes de vértigo y ataxia principalmente, las

cuales no necesariamente tienen una degeneración progresiva, mientras que las ataxias espinocerebelosas llamadas SCAs (*del inglés Spinocerebellar Ataxias*), también con un patrón de herencia autosómica dominante, sí presentan una degeneración progresiva, además son las más comunes dentro de las ataxias hereditarias, por lo que se les considera como el grupo de ataxias de mayor importancia dentro de las ataxias de origen genético. La prevalencia de todas las ataxias hereditarias es cercana a un rango de 2.7 a 6.5/100,000 habitantes, pero para las ataxias espinocerebelosas la prevalencia estimada es de 5-7/100,000. Sin embargo estas estimaciones son variables dependiendo de los países y continentes estudiados.^{6,7}

2.1.1 Ataxias autosómicas dominantes

El gran grupo de desórdenes neuropatológicos, heredadas por un patrón autosómico dominante conocidas como SCAs, se caracterizan por mostrar una heterogeneidad clínica, genética y neuropatológica. Los pacientes que presentan algún tipo de SCA, se distinguen clínicamente por una marcha atáxica, disartria cerebelosa, dismetría, disdiadococinesias, temblor postural, entre otras manifestaciones cerebelosas. En algunos tipos de SCAs se pueden distinguir expresiones extracerebelosas como son: trastorno cognitivo, signos piramidales y extrapiramidales, oftalmoplejía, patología del sueño, fatiga, retinopatía, entre otros; los cuales son característicos de cada tipo de SCA dado.^{3,6,7}

Inicialmente, a principios de los 80's, se clasificaron como ADCAs (*del inglés Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia*) fundamentadas en sus características clínicas: a) ADCA tipo 1, asociada a ataxia y la degeneración de otros sistemas neuronales, b) ADCA tipo 2, asociada a ataxia y a la degeneración de la retina, c) ADCA tipo 3, asociada a ataxia cerebelosa pura y más recientemente ADCA tipo 4, asociada a ataxia con movimientos mioclónicos.⁸ Sin embargo, la variabilidad de características clínicas provoca que el diagnóstico en estas patologías sea complicado, además de existir un solapamiento entre el fenotipo y el genotipo, lo que hace necesario clasificar a los diferentes tipos de SCAs mediante su vinculación a la mutación que la origina. Actualmente con los avances de la biología molecular se han descrito alrededor de 36 variedades de SCAs (Tabla 1), ayudando a tener una correlación clara de fenotipo-genotipo.^{9,10}

2.2 Mutaciones genéticas asociadas a ataxias espinocerebelosas

Aunque las SCAs comparten un mismo tipo de herencia autosómica dominante, genéticamente son provocadas por diferentes variaciones, tales como: mutaciones puntuales, como es el caso de SCA27 en donde se presenta la mutación en el exón 4 del gen *FGF14* ubicado en el cromosoma 13¹¹, mutaciones en el marco de lectura, como es el caso de SCA11 que afecta al gen *TTBK-2* que codifica para la enzima tau tubulina 2¹², o en SCA15 y SCA20 donde se presentan alteraciones cromosomales como deleciones y duplicaciones, respectivamente (Tabla 1). No obstante, el tipo de mutación más común entre las SCAs son las expansiones anormales de repetidos trinucleótidos, pentanucleótidos o hexanucleótidos en regiones génicas tanto codificantes como no codificantes del ADN (Tabla 1).¹⁵

Tabla 1. Ataxias autosómicas dominantes.

SCA	Gen	Locus	Mutación	Características Clínicas*
SCA1	<i>ATXN1</i>	6p23	(CAG)n	Demencia
SCA2	<i>ATXN2</i>	12q24	(CAG)n	Demencia
SCA3	<i>ATXN3</i>	14q24.3-q31	(CAG)n	Demencia
SCA4	ND	16q22.1	ND	Neuropatía
SCA5	<i>SPTBN2</i>	11p11-q11	Sentido erróneo	Ataxia cerebelosa pura
SCA6	<i>CACNA1A</i>	19p13	(CAG)n	Ataxia cerebelosa pura
SCA7	<i>ATXN7</i>	3p12-p21.1	(CAG)n	Retinopatía pigmentaria
SCA8	<i>ATXN8</i>	13q21	(CTG)n	Ataxia cerebelosa pura
SCA10	<i>ATXN10</i>	22q13	ATTCT	Epilepsia
SCA11	<i>TTBK2</i>	15q14-q15.3	Cambio en el ML	Ataxia cerebelosa pura
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	5q31-q33	(CAG)n	Temblor
SCA13	<i>KCNC3</i>	19q13.3-q13.4	Sentido erróneo	Retraso mental y motor
SCA14	<i>PRKCG</i>	19q13.4	Sentido erróneo	Mioclonía
SCA15/16	<i>ITPR1</i>	3p26-p25	Sentido erróneo	Ataxia cerebelosa pura
SCA17	<i>TBP</i>	6q27	(CAG)n	Demencia y temblor
SCA18	<i>SCA18</i>	7q22-q23	Sentido erróneo	Neuropatía
SCA19	<i>SCA19</i>	1p21-q21	ND	Mioclonía
SCA20	<i>SCA20</i>	11q12.2-11q12.3	ND	Duplicación
SCA21	<i>SCA21</i>	7p21-p15.1	ND	ND
SCA23	<i>PDYN</i>	20q13-p23	Sentido erróneo	Ataxia cerebelosa pura

SCA25	ND	2P21-P13	ND	Neuropatía
SCA26	SCA26	19p13.3	ND	Signos cerebelosoes puros
SCA27	<i>FGF14</i>	13q34	Sentido erróneo	Temblor
SCA28	<i>AFG3L2</i>	18p1-q11	Sentido erróneo	Oftamoplejia
SCA30	SCA30	4q34.3-q35.1	ND	ND
SCA31	<i>BEAN-TK2</i>	16q22.1	(TGGAA) _n	Sordez
SCA35	<i>TGM6</i>	20p13-12.2	Sentido erróneo	ND
SCA36	<i>NOP56</i>	20p13	GGCCTG	Daño en la neurona motora

*Adicionales a las comunes. ND= No definido

Cuando el aumento de repetidos trinucleótidos se origina en regiones codificantes, comúnmente la unidad de repetición de esta mutación es el trinucleótido Citosina/Adenina/Guanina (CAG) que codifica para el aminoácido llamado glutamina. Este tipo de mutación es la que presentan varios tipos de SCAs, por lo que también son denominadas ataxias poliglutamínicas. Es importante mencionar que en la actualidad hay varios tipos de SCA donde no ha sido posible determinar el tipo de mutación que genera la enfermedad como es el caso de SCA26, SCA29 o SCA30, y otras tantas que no han sido asociadas a un locus específico, por lo que se espera que en años subsecuentes aumente el número de SCAs.⁷

2.2.1 Expansión anormal de repetidos trinucleótidos

Un polimorfismo (del Griego, poli: muchas, formas: formas) está dado por la existencia de dos o más variantes discretas en una población, llamados alelos, y su frecuencia en dicha población debe de ser mayor al 1%, cuando estas variantes se presentan en menos de este porcentaje son llamadas mutaciones.¹³

Los microsatélites o también conocidos como STRs (*del inglés Short Tandem Repeat*), son repeticiones que van desde 1 a 6 nucleótidos organizados en tándem. Se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma, representando cerca del 3% del mismo. Se clasifican de acuerdo a la longitud de la unidad de repetición como es mono-, di-, tri-, tetra-, penta- y hexanucleotidos; también pueden ser clasificados por el tipo de secuencia repetitiva, es decir, en perfectos, imperfectos, interrumpidos o en compuestos (Tabla 2).¹⁴

Los polimorfismos del tipo microsatélite deben su variabilidad principalmente a la longitud de sus alelos, más que a las diferencias en la secuencia de ADN. Los STRs son altamente polimórficos y generalmente presentan una baja tasa de mutación, en ocasiones pueden

comportarse de manera inestable presentando expansiones en el número de unidades repetidas durante los procesos de mitosis y/o meiosis.¹

Tabla 2. Clasificación de los STRs de acuerdo a su longitud y tipo de secuencia

Clasificación de STRs de acuerdo a su longitud de la unidad de repetidos.	
A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A	Mononucleótidos
CA-CA-CA-CA-CA-CA-CA-CA-CA	Dinucleótidos
CAG-CAG-CAG-CAG-CAG-CAG	Trinucleótidos
TGAC-TGAC-TGAC-TGAC-TGAC	Tetranucleótidos
TCATC-TCATC-TCATC-TCATC	Pentanucleótidos
TGCATG- TGCATG- TGCATG-	Hexanucleótidos
Clasificación de STRs de acuerdo al tipo de secuencia repetitiva.	
CAG-CAG-CAG-CAG-CAG-CAG	Perfectos
CAG-CAG-CTG-CAG-CAG-CAG-CAG	Imperfectos
CAG-CAG-CAG-CAG-GGTC-CAG-CAG	Interrumpidos
CAG-CAG-CAG-CAG-GGC-GGC-GGC	Compuestos

En los últimos 40 años se ha encontrado que expansiones anormales de las secuencias tipo microsatélite principalmente repetidos de trinucleótidos, están asociados con más de 40 enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares, entre las que encontramos a la enfermedad de Huntington (EH), distintos tipos de ataxias, como la FRDA y una gran cantidad de SCAs, así como también a la Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1) y 2 (DM2), por mencionar algunas (Figura 1)¹⁵.

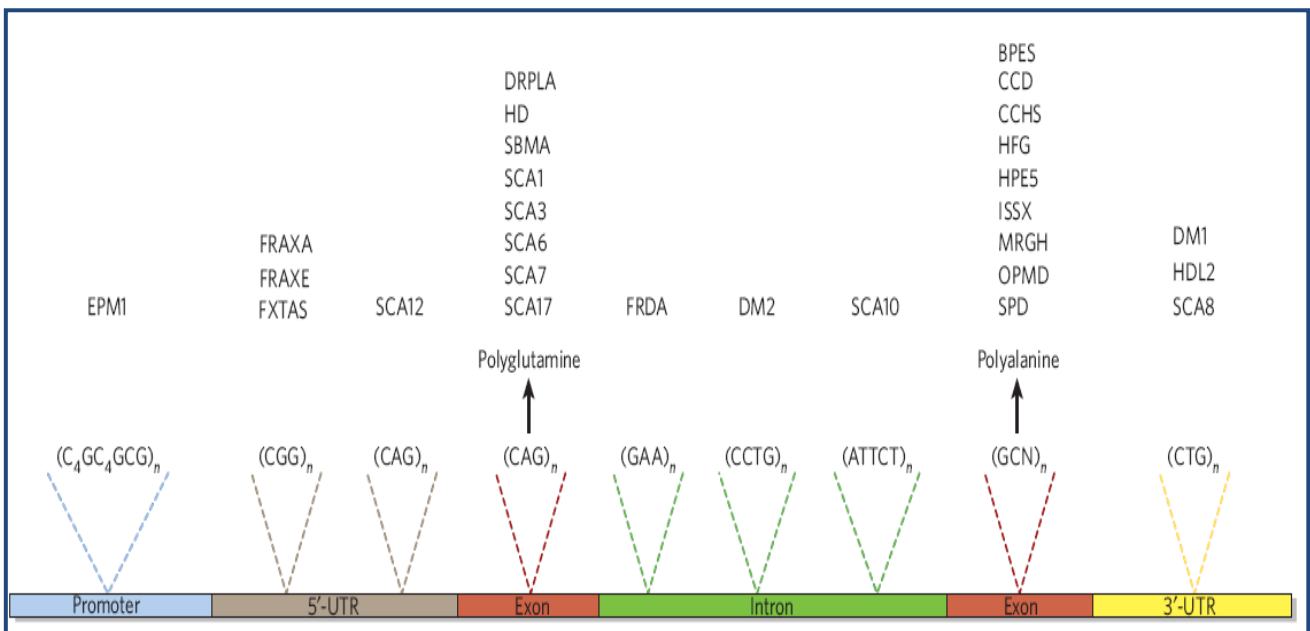


Figura 1. Distintas expansiones anormales de repetidos causan un gran número de enfermedades neurológicas.¹⁵

Existe una gran cantidad de SCAs causadas por expansiones de trinucleótidos, la mayor parte se encuentra dentro de regiones codificantes, como es el caso de SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y SCA17 (Figura 1).

2.2.2 Mecanismos de inestabilidad genética.

Los marcadores tipo microsatélite tienen una tasa de mutación en un rango aproximado de 10^{-6} a 10^{-2} . En trinucleótidos asociados a enfermedades la tasa de mutación aumenta considerablemente, es por ello que también se les llama mutaciones dinámicas.¹⁶ A lo largo del tiempo, se han establecido varios modelos donde se explica el comportamiento dinámico expansión/contracción de las secuencias que incluyen estos repetidos, principalmente están involucrados procesos genéticos en donde ocurre una separación entre las dos hebras del ADN, como es el caso de la replicación, recombinación y sistemas de reparación, que pueden actuar de forma independiente o en conjunto. La formación de estructuras secundarias no comunes del ADN (Figura 2), son la principal causa de que se originen estas modificaciones estructurales.

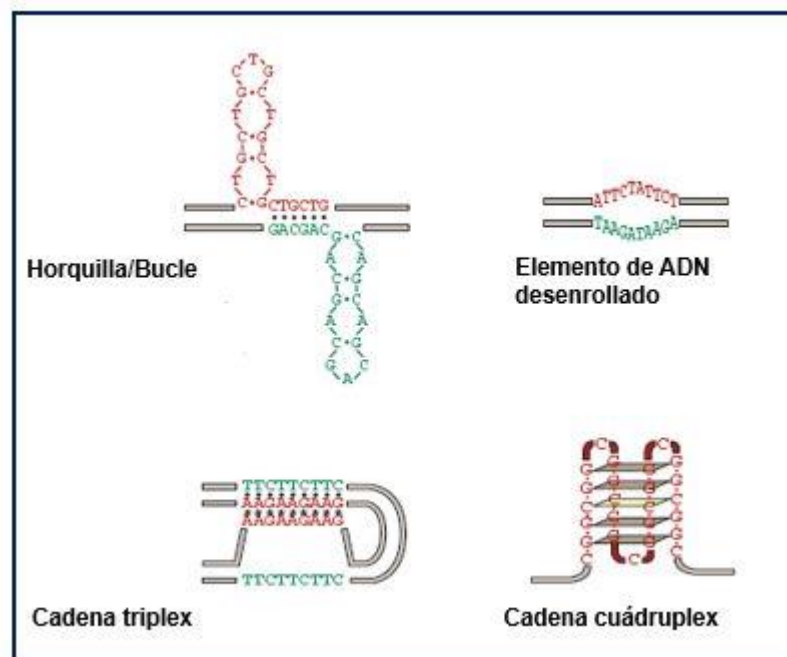


Figura 2. Estructuras secundarias diferentes a la B-ADN¹⁵.

Los primeros modelos de inestabilidad en la replicación del ADN se basaron en los errores de desplazamiento de la ADN polimerasa cuando ocurre la síntesis de la cadena naciente. Las expansiones ocurren cuando se forman estructuras secundarias, ocasionadas principalmente por el resbalón de la ADN polimerasa (Figura 3). En diferentes estudios se

ha observado que la inestabilidad depende de la orientación, es decir, cuando estos bucles aparecen en la cadena conductora la probabilidad de tener una contracción aumenta, pues la región de repetidos dentro del bucle no es amplificado. La ubicación de los repetidos juega un papel importante en la inestabilidad. Se ha encontrado que repetidos más cerca del origen de replicación son más inestables que aquellos que están más alejados del mismo origen. Sin embargo, para expansiones de trinucleótidos al parecer existen otros factores de mayor importancia que originan la inestabilidad de los repetidos.¹⁵

Otro factor importante que aporta inestabilidad genética durante la replicación es la presencia de mutaciones en genes que codifican proteínas involucradas en la replicación tales como la endonucleasa FEN1 (Flap Endonuclease 1).^{16,18}

Los modelos de reparación son los que mejor explican la mutación dinámica en aquellas células quiescentes o que no tienen una replicación como tal. La inestabilidad en este tipo de células depende principalmente del daño oxidante cerca o dentro de la región en donde se encuentran los repetidos.¹⁹

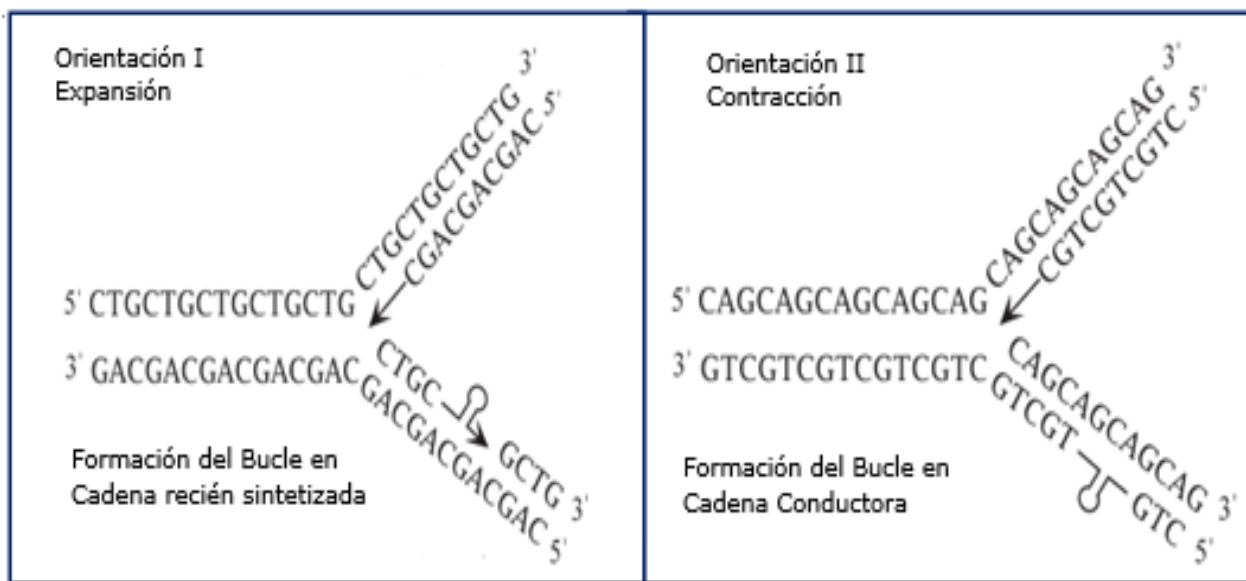


Figura 3. Mecanismo de replicación. Se describe las dos orientaciones que provocan las expansiones y/o contracciones.¹⁸

Los principales modelos en este mecanismo involucran una reparación en el apareamiento erróneo (Mis Match Repair, MMR) y reparación por eliminación de nucleótidos (Nucleotides Excision Repair, NER). Esta última es capaz de reconocer una lesión en el ADN que genera un cambio importante en la estructura de la doble hélice, como es el caso de las estructuras presentadas en la figura 2. La importancia de la vía NER es que esta se

relaciona con la reparación de las cadenas que se están transcribiendo lo que constituye una fuente para la formación de bucles. La vía MMR es muy importante en la reparación pues es fundamental para corregir bases mal apareadas y estructuras secundarias no comunes del ADN (Figura 2). Usando un modelo de ratón transgénico para las enfermedades de Huntington y distrofia miotónica se observó que una inactivación de las proteínas involucradas en la reparación tales como MSH2 (MutS homologue 2) y MSH3 (MutS homologue 3) reducía las expansiones de repetidos durante la transmisión intergeneracional.^{18,19} Mutaciones en proteínas de estos sistemas de reparación podrían contribuir en una expansión inicial de los tripletes repetidos. Existe una afinidad entre la estructura secundaria no común del ADN y el complejo MSH2-MSH3, pues este último es atraído por los apareamientos incorrectos dentro del bucle, de acuerdo a estos estudios se sugiere que el complejo de las proteínas reparadoras podría estar estabilizando las estructuras secundarias del ADN.²⁰

Sin embargo los procesos mitóticos no son los únicos que pueden generar estas estructuras diferentes a la B-ADN, sino que también varias vías de recombinación a nivel de la meiosis pueden inferir en esta inestabilidad, principalmente cuando ocurre un entrecruzamiento desigual, dando oportunidad a que se formen estructuras similares como las presentadas en la figura 2, que posteriormente con la ayuda de la maquinaria involucrada en la reparación o replicación se presentan las expansiones o contracciones de manera similar a los procesos ya antes explicados.^{18,20} Es indudable que los mecanismos exactos por los que se produce la inestabilidad aún no se conocen por completo y que podrían existir otras vías que pudiesen estar implicadas.

2.3 Genética y patofisiología de las SCAs poliglutamínicas

Como se mencionó anteriormente, la mutación genética que origina a las SCAs poliglutamínicas consiste en la expansión anormal del trinucleótido CAG en la región codificante de diversos genes, los cuales cuentan con un número de repeticiones que representa un umbral entre el estado normal y patológico para cada una de las diferentes SCAs, de tal manera que un incremento que rebase el umbral origina la aparición del fenotipo clásico de las SCAs (Tabla 3). Algunas de estas enfermedades presentan un rango de baja penetrancia, es decir, cuando tienen un cierto número de repetidos, los individuos pueden o no presentar una sintomatología, dependiendo de algunas variables aún no establecidas. Es importante mencionar que también algunos tipos de SCA (SCA1 y

SCA7) presentan alelos intermedios, también conocidos como rango de “pre-mutación”, donde no se presenta la enfermedad pero es muy probable que en generaciones sucesivas ocurra una inestabilidad que provoque que el número de repetidos se expanda y se presente el fenotipo de SCA.²²

Tabla 3. Características de las SCAs poliglutamínicas

SCAs	Gen	Alelos normales	Alelos intermedios	Alelos baja penetrancia	Alelos alta penetrancia
SCA1	ATXN-1	6 a 35	36 a 38	-----	39 a 91 CAG
SCA2	ATXN-2	13 a 31 CAG	-----	-----	32<CAG>200
SCA3	ATXN-3	<31 CAG	-----	45 a 51	52 a 86
SCA6	CACNA1A	<18 CAG	-----	-----	20 a 33 CAG
SCA7	ATXN-7	7 a 18	28 a 33	34 a 36	37 a 460
SCA17	TBP	25 a 42	-----	43 48	49 a 66

Las SCAs poliglutamínicas presentan el fenómeno de anticipación, el cual consiste en un inicio más temprano de la enfermedad y una mayor severidad de la sintomatología en generaciones sucesivas de las familias afectadas, lo que coincide con un aumento en el número de repetidos CAG. Los síntomas aparecen cuando se rebasa el umbral de repeticiones de CAG, y presentan una selectividad neuronal específica.²⁷

El ARN mutado tiene la capacidad de traducirse y originar proteínas que cuentan con una expansión anormal del tracto poliglutamínico, estas proteínas anormales son propensas a formar agregados de manera *in vitro* e *in vivo*, debido a la conformación β -plegada de la proteína que origina su oligomerización. Este grupo de proteínas mutadas, pueden presentar modificaciones post-traduccionales como la escisión proteolítica ocasionada principalmente por caspasas, dando como resultado fragmentos cortos tóxicos que forman agregados de una manera más rápida que aquellas proteínas que no sufren escisión.^{23,24} La acumulación de agregados da pie a la existencia de inclusiones nucleares o citoplasmáticas, las cuales pueden reclutar otras proteínas tales como las chaperonas que son componentes importantes de la maquinaria de control de calidad celular.²⁵ Se ha asumido que estos agregados tienen un efecto tóxico asociado a la muerte celular programada de las células que los presentan, pero aún no es claro como las inclusiones celulares participan en la patogénesis de este conjunto de enfermedades. Por otro lado, se ha propuesto también que al formarse los agregados se pierde toxicidad de la proteína

mutada que contiene la expansión anormal de glutaminas, lo que probablemente sea un efecto neuroprotector. Estos mecanismos son contradictorios, por lo que es necesario identificar mayor evidencia para dilucidar el mecanismo que lleva a la muerte celular de las células que presentan la expresión de la proteína mutada.²⁶

Así mismo la acumulación de los agregados en el núcleo hace pensar que probablemente las proteínas mutadas tengan una interacción con algunos factores o cofactores de transcripción. La interacción de algunas proteínas puede contribuir al proceso neurodegenerativo específico como sucede en SCA1 y SCA7. La proteína LANP (Leucine rich acidic nuclear protein) interactúa con ataxina 1 explicando la neurodegeneración de las células de Purkinje (CP) en SCA1, mientras que en SCA 7 la ataxina 7 interactúa con la proteína homeobox cono-bastón CRX contribuyendo a la degeneración de la retina en SCA7. Esto sugiere que una interacción específica puede restringir la citotoxicidad a ciertos tipos de neuronas dentro del sistema nervioso central.^{27,28}

2.3.1 Epidemiología de las SCAs poliglutamínicas

Los estudios de prevalencia de las SCAs revelan la existencia de algunas regiones geográficas con una alta incidencia. De acuerdo con diversos informes en la literatura se considera que la SCA3 es la ataxia más común a nivel mundial con un porcentaje de 21%, seguida por la SCA2 y la SCA6 con 15% cada una y después la SCA1 y SCA7 con 6% y 5%, respectivamente. No obstante, la incidencia de las SCA varía dependiendo la región geográfica, además de la influencia de fenómenos genético-poblacionales. Por ejemplo, la SCA3 es más común en Brasil, China, Alemania y Portugal, mientras que la SCA2 es la ataxia más frecuente en Cuba, India y el sur de Italia, asimismo la SCA6 en Japón. Por lo tanto es necesario realizar estudios de identificación de estas patologías en diversas poblaciones mediante estudios moleculares que puedan determinar el tipo específico de cada SCA.²⁹

2.3.2 Panorama de las SCAs en México

En nuestro país no existen datos epidemiológicos sobre las SCAs; el único estudio publicado anteriormente se basó en el análisis de 108 individuos mexicanos con características clínicas de ataxia espinocerebelosa y se determinó que la ocurrencia de las diferentes SCAs en nuestro país es la siguiente: SCA2 (45.4%), seguida distantes por SCA10 (13.9%), SCA3 (12%), SCA7 (7.4%) y SCA17 (2.8%)³⁰. Sin embargo, la mayoría

de los casos analizados se reclutaron en la región centro del país, por lo que estos datos podrían no reflejar la incidencia de las SCAs a lo largo y ancho de nuestro país.

Con la finalidad de impulsar el estudio clínico y genético de las SCAs en México, en el laboratorio de medicina genómica del departamento de genética en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) se dio a la tarea de implementar un diagnóstico molecular eficaz y rutinario para las ataxias espinocerebelosas autosómico dominante tipo 1, 2, 3, 6 y 7, (las ataxias más comunes a nivel mundial), el cual se basa en una reacción de PCR multiplex acoplada a electroforesis capilar.³¹ Una vez establecido el diagnóstico molecular para las diferentes SCAs se iniciaron estudios para determinar su frecuencia en diferentes regiones del país. De manera interesante, se identificó que una región central del estado de Veracruz presenta una alta incidencia de SCA7 (Tabla 4). Los portadores se concentran en 5 diferentes comunidades que cubren un área de aproximadamente 1,400 Km² (Figura 4).

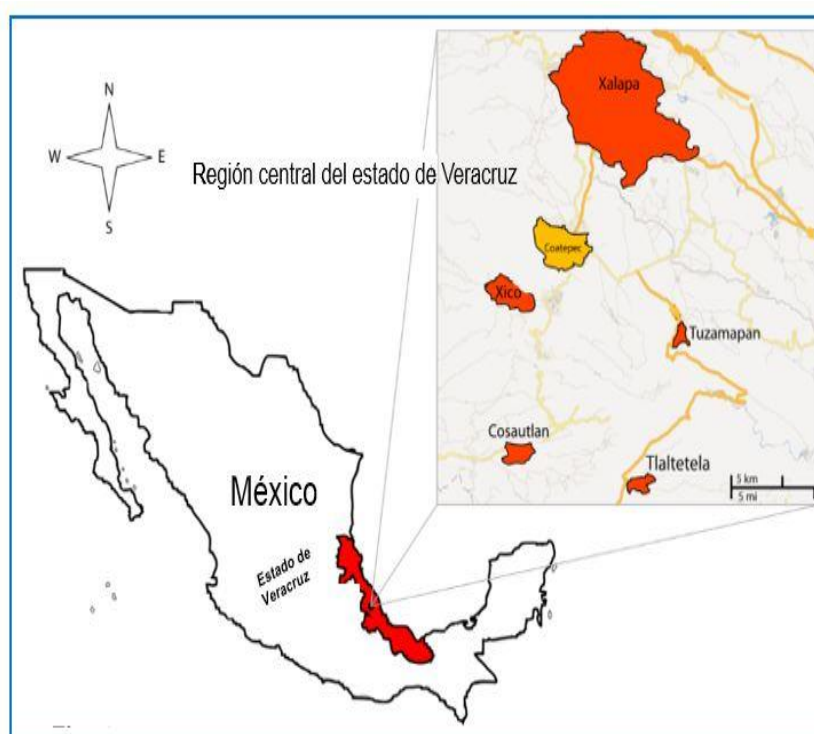


Figura 4. Origen geográfico de los portadores con SCA2 y SCA7, dentro del estado de Veracruz.³²

De manera particular la comunidad de Tlaltetela presenta una prevalencia de 817.14/100,000 habitantes, y la de Tuzamapan una prevalencia de 161.2/100,000; datos que las sitúan como las poblaciones con mayor incidencia de SCA7 a nivel mundial y que representan la serie de casos más grande descrita a nivel mundial para SCA7. El hallazgo

de una población con alta incidencia de SCA7, una patología poco descrita a nivel mundial, abre perspectivas interesantes para su estudio en nuestro país.³²

Tabla 4. Distribución de portadores con SCA y la tasa de prevalencia en el Estado de Veracruz.

Comunidad	Habitantes	Portadores SCA2	Tasa de Prevalencia	Portadores SCA7	Tasa de Prevalencia
Xalapa	457 928	0	0	3	0.66
Tlaltetela	4 528	6	132.51	37	817.14
Tuzamapan	6 824	0	0	11	161.2
Cosautlán	4 429	0	0	4	90.31
Xico	35 188	3	8.53	0	0
Total	508 897	9	1.74	55	10.63

2.4 Ataxia espinocerebelosa tipo 7

Clínicamente presenta características similares a otras ataxias como la ataxia cerebelosa que se acompaña de disfagia, dismetrías y disdiadococinesias. El inicio suele ser de 20 a 40 años, siendo la media de 30 años, sin embargo existe una marcada anticipación de la edad de inicio y de la velocidad de progresión, por lo que en ocasiones inicia antes en los hijos que en los padres.² A diferencia de otras ataxias, suele ser muy notorio el deterioro visual, que inicia de visión central y evoluciona a ceguera total, sin embargo en el desarrollo de esta alteración inicialmente se presenta deterioro de la percepción de colores azul y amarillo que inicia años antes de notarse la falla visual.³³

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 es una de las seis SCAs poliglutamínicas, causada por una expansión anormal de una secuencia de repetidos CAG que se encuentran en el tercer exón del gen llamado *ATXN7* dentro del brazo corto del cromosoma 3. El intervalo de repetidos CAG va de 7 a 34 en individuos sanos, donde 10 repetidos CAG es el alelo más común. Esta patología presenta alelos intermedios o alelos normales mutables que van de 28 a 34 repetidos CAG, los individuos que porten alelos dentro de este rango no presentarán la enfermedad pero hay una alta probabilidad de expandirse en la transmisión a su descendencia pues son meióticamente inestables, los alelos de baja penetrancia abarcan un rango de 34 a 36 unidades CAG mientras que los alelos de alta penetrancia se encuentran en un intervalo de repetidos CAG de 37 hasta 460.^{2,3}

El gen *ATXN7* codifica para la proteína llamada Ataxina 7, de la cual sólo se conoce de manera parcial su función. La expresión de Ataxina 7 es ubicua, lo que incluye diferentes regiones del cerebro y regiones no neuronales, sin embargo, cuando se presenta la patología, la ataxina 7 mutada presenta una restricción en el tejido neuronal, similar a otras ataxinas.^{3,7}

2.4.1 Ataxina 7

La proteína ataxina 7 está compuesta por 892 aminoácidos y se han identificado cuatro genes parálogos a *ATXN7* en el genoma humano, que son denominados *SCA7* o *ATXN7*, *SCA7-L1*, *SCA7-L2*, *SCA7-L3*, codifican para ataxina 7, ataxina 7-L1, ataxina 7-L2, ataxina 7-L3, respectivamente. (Figura 5).³⁴ Se han identificado diversas proteínas homólogas en diferentes genomas, por ejemplo la proteína ortóloga a ataxina 7 de levadura, denominada SFG73 que es codificada por *YGL066w*, ha sido utilizada como base en la identificación de la función proteica de ataxina 7. En la levadura ha sido identificada como una subunidad del complejo SAGA (Spt/Ada/Gcn5 acetylase), el complejo SAGA en la levadura actúa como un coactivador de la transcripción presentando una actividad acetiltransferasa en histonas y a su vez regulado por GCN5.^{4,5} Análogamente, se ha asociado con la actividad acetiltransferasa de histonas en el humano, ya que ataxina 7 forma parte del complejo homólogo de SAGA que en humanos es llamado complejo STAGA (SPT3-TAF9-GCN5 acetyltransferase).^{34, 35, 36}

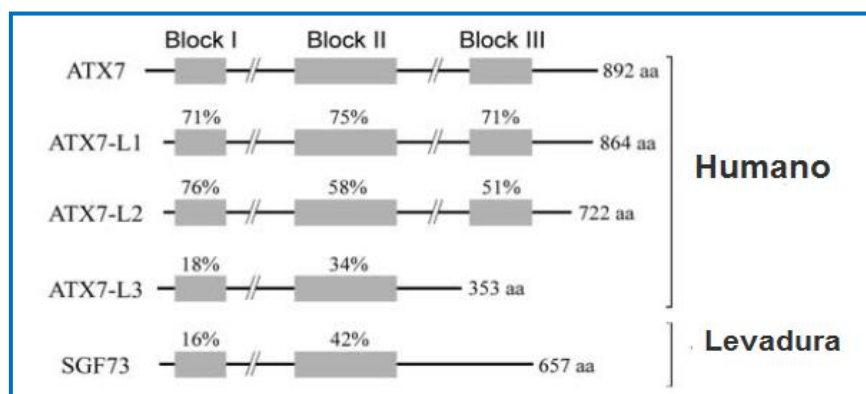


Figura 5. Representación gráfica de la familia ataxina 7 en humanos y en levadura. Las cajas grises representan los bloques conservados en ataxina 7.³⁴

Dentro de la estructura de ataxina 7 se encuentran al menos dos secuencias de localización nuclear (SLN) y una secuencia señal de exportación nuclear (SEN) rico en Leucina, lo que le permite ir del núcleo al citoplasma y viceversa, así mismo contiene un dominio de unión a Zinc entre los residuos 311 y 406, y este probablemente es el que

permite tener una interacción con la acetiltransferasa de histonas en el complejo STAGA.^{35,36}

Por otro lado, se ha identificado que el tracto poliQ de ataxina 7 es fundamental para la unión a la proteína Crx (ConeRod-Homeobox) la cual es una proteína de homeodominio que se une a promotores de varios genes específicos pertenecientes a células fotorreceptoras, lo que podría explicar las anomalías visuales en estos pacientes.³⁵ Últimamente se ha encontrado que la proteína ataxina 7 normal presenta una asociación con los microtúbulos (MT) ayudando a estabilizarlos, principalmente esta unión está dada por α -tubulina, lo que sugiere que la proteína mutada podría afectar en la estructura citoplasmática de las células, así como en la comunicación intracelular. Finalmente, también se ha observado que la localización de ataxina 7 en el núcleo y en el citoplasma cambia dinámicamente con respecto al ciclo celular, presentando una concentración abundante en el núcleo después de la mitosis y en una proporción menor en el citoplasma para ayudar a la estabilización de los MT's.³⁷

2.4.2 Patogénesis de SCA 7

Dentro de los mecanismos fisiopatológicos en la SCA7, se considera que la expansión poliglutamínica genera una función tóxica que afecta a grupos neuronales específicos en el ser humano, tales como las CP, neuronas del puente de Varolio, motoneuronas del asta anterior de la médula espinal y de los núcleos motores de los nervios craneales. El grado de degeneración se relaciona con el tamaño de la expansión poliglutamínica y se expresa fenotípicamente por alteraciones motoras y cognitivas.³⁸

Las proteínas con expansiones poliglutamínicas se caracterizan por un plegamiento anormal y la formación de agregados en forma de inclusiones. Estas inclusiones se localizan fundamentalmente a nivel del núcleo y se han observado en menor medida a nivel del citoplasma de las neuronas donde se expresan las mismas. La acumulación de estas inclusiones en la célula desencadena una serie de efectos que conducen a la muerte celular y por lo tanto, a la degeneración de las estructuras neurales periféricas y centrales. La agregación de las proteínas mutadas suele ocurrir cuando las secuencias de glutaminas sobrepasan determinado umbral, generalmente entre 36 y 40.⁷

Por otro lado, aún existen controversias en relación a, si este mecanismo autónomamente es capaz de provocar la neurodegeneración, ya que otros autores hacen referencia a un

posible papel protector de los mismos. Sin embargo, otras evidencias sugieren que la disminución de la carga poliglutamínica disminuye la neurotoxicidad.^{3,7,34}

La vulnerabilidad de ciertos linajes neuronales específicos, no se ha podido explicar; por lo que el mecanismo patogénico puede ser específico aunado a la formación de los agregados proteicos. La presencia de repetidos CAG anormales en las regiones codificantes, parecen no afectar la integridad de la proteína. Por lo que dicha mutación parece afectar directamente en la función normal de las proteínas codificadas.⁴⁰

La función anormal de las proteínas mutadas puede explicarse por los cambios aberrantes en las modificaciones post-traduccionales (fosforilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación o los cambios en la escisión proteolítica), lo que origina modificaciones en la interacción de la proteína mutada con otras proteínas a nivel celular, lo cual desencadena variaciones en diversas vías de señalización.⁴¹

Aunque aún no es del todo claro la patogénesis de SCA7 existen modelos que ayudan a explicar los posibles mecanismos de esta patología, los cuales incluyen en primer lugar la formación de inclusiones nucleares que podrían estar implicados en el secuestro de factores de transcripción dando como resultado una mala regulación transcripcional.^{39,40}

En modelos celulares y en estudios in vitro se ha observado que la proteína ataxina 7 mutada es sustrato de la caspasa 7, una proteasa intracelular que corta principalmente en dos residuos de ácido aspártico (266 y 344) pertenecientes al producto del gen *ATXN7*, como resultado de la escisión proteolítica se obtienen dos fragmentos con 266 y 344 residuos de aminoácidos, los cuales contienen la expansión anormal del trinucleótido CAG cerca del extremo N-terminal, pero dichos fragmentos quedan ausentes de las secuencias SLN y SEN, lo que promueve la formación de agregados dentro del núcleo, aumentando la toxicidad y la muerte celular, es por ello que la escisión proteolítica es un punto importante en la patogénesis de SCA7, además de que podría ser un blanco terapéutico.⁴²

Aunque la proteína mutada de Ataxina 7 tiene una expresión generalizada a través del cuerpo, la patología es restringida principalmente a una degeneración de cerebelo y retina. Dentro del cerebelo afecta de manera general a las tres capas celulares (Figura 6) mientras que las CP no presenta como tal inclusiones nucleares, pero sí una degeneración en la ramificación dendrítica, esto se observó en un modelo de ratón MoPrP (Murine Prion

Protein) con 92 repetidos de CAG dentro del gen *ATXN7*. También se han reportado estas mismas características en pacientes con SCA7.^{38,40}

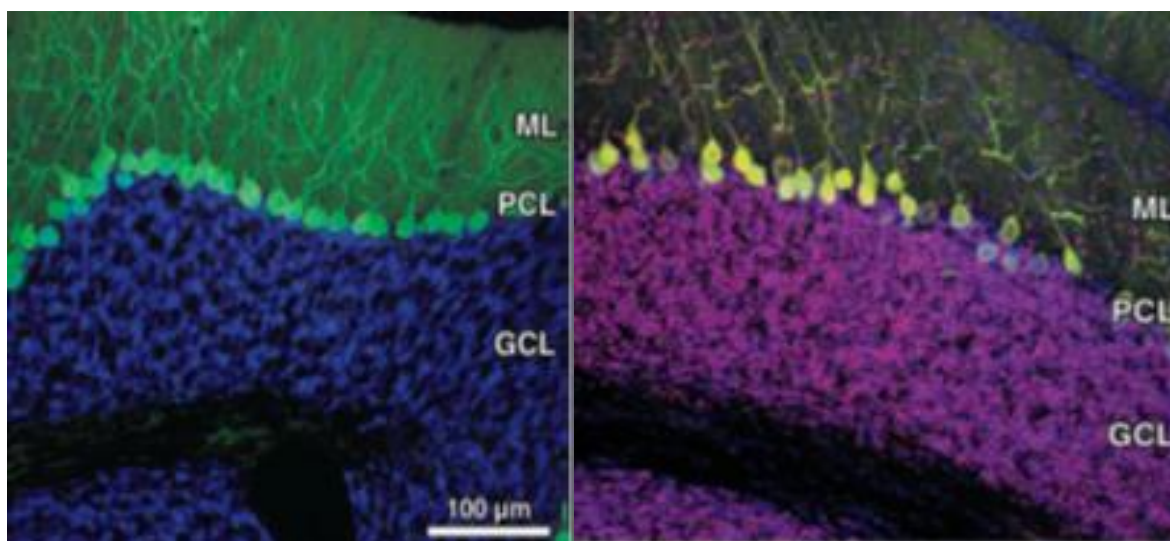


Figura 6. Degeneración de las CP y la formación de agregados nucleares en otras células cerebelosas. Agregados nucleares en células de la capa molecular tales como células estrelladas, en cesta y de Golgi, así como en células granulosas pertenecientes a la capa más profunda del cerebelo. En las CP no se observan agregados nucleares, pero sí una degeneración en las dendritas. Inmunotinción con anticuerpo de ataxina 7 (magenta), anticuerpo calbindina (verde) DAPI (azul).³⁸

Por otro lado, la retina está compuesta por diferentes tipos de neuronas como las células fotorreceptoras, las células amacrinas, las células horizontales y las células ganglionares. En SCA7 la distrofia en la retina es causada por una pérdida de células fotorreceptoras que incluyen a los conos y bastones las cuales contienen pigmentos visuales que absorben distintos tipos de luz (la fopsina y rodopsina), además de una pérdida de células ganglionares⁴¹. Se han realizado estudios en modelos de ratones transgénicos que expresan tanto la proteína de ataxina 7 mutada como la normal sobre el promotor del gen de la rodopsina y se ha encontrado una mala regulación en el promotor perteneciente a rodopsina. Por otra parte la distrofia de la retina se asocia a mutaciones en el factor de transcripción CRX (cone-rod homeobox) el cual está involucrado en la regulación de genes fotorreceptores específicos, esto se relaciona con la interacción que tiene Ataxina 7 con este factor de transcripción pues se ha visto que cuando se forman las inclusiones nucleares, el factor de transcripción CRX queda atrapado dentro de ellas.^{43,44} La interacción entre la proteína ataxina 7 y el factor de transcripción CRX, es mediada por una región rica en glutamina de CRX y por el tracto poliglutamínico de Ataxina 7 que está

cercano al extremo N-terminal. La presencia de la proteína mutada provoca que el extremo C-terminal sea indispensable para generar una represión de los promotores dependientes del factor CRX y posteriormente causar una retinopatía. El complejo coactivador STAGA participa en la transcripción de algunos genes fotorreceptores dependientes del factor CRX. Se ha propuesto que la ataxina 7 pueda participar en la unión del complejo STAGA-CRX, y además también posiblemente sea una subunidad del complejo coactivador STAGA. Uno de los principales componentes de este complejo es la enzima GCN5 que con ayuda de ataxina 7 se encarga de acetilar principalmente al residuo de lisina perteneciente a la histona H3, GCN5 además de ataxina 7 necesita a las proteínas adaptadoras (ADA2 y ADA3), que también pertenecen al complejo STAGA y se ha observado que al tener una proteína de ataxina 7 mutada dentro el complejo STAGA, se inhibe su actividad de acetiltransferasa llevada a cabo por GCN5 (Figura 7) ^{41,43,44}

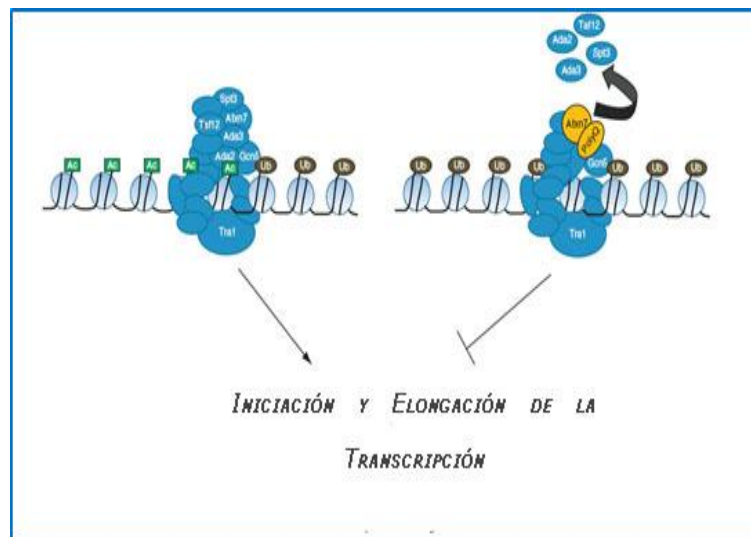


Figura 7. Incorporación de Ataxina 7 mutada dentro del complejo STAGA. Ataxina 7 actúa interfiriendo con su actividad catalítica. ⁴¹

2.4.3 Origen de la SCA7: Efecto fundador

A nivel mundial, la alta incidencia de las ataxias espinocerebelosas depende de las zonas geográficas estudiadas, se han encontrado casos en donde las frecuencias alélicas relacionadas a la mutación son muy altas en regiones pequeñas de diferentes puntos del mundo, como es el caso de SCA6 en Japón, SCA2 en Cuba, SCA3 en Camboya, SCA7 en países Nórdicos y últimamente se ha reportado que en México (específicamente en el estado de Veracruz) se tiene un gran número de casos de SCA7, esto nos podría hacer

pensar que probablemente estos casos se deben a la presencia de un efecto fundador.^{32,46,47,48}

Con respecto a SCA7 se informó una alta incidencia en los países Escandinavos principalmente en Finlandia y Suecia, en donde se evaluaron 5 tipos de SCAs (SCA1, 2, 3, 6, 7 junto con la ataxia FDRA). Se obtuvo un alto número de casos para SCA7, representado un total de 37 portadores conformados en 15 familias diferentes (8 familias de Suecia y 7 familias de Finlandia). Mediante un análisis de haplotipos a través de marcadores genéticos ligados a la mutación de SCA7 (nueve microsatélites y un polimorfismo intragénico cercanos al locus de SCA7). Se confirmó que las 15 familias analizadas comparten un haplotipo común.⁴⁹

Además de la alta frecuencia en los países Escandinavos, se han reportado numerosos casos en Sudáfrica y en menor cantidad en países de diferentes zonas geográficas como Francia, Israel, Marruecos, Corea, Brasil y Estados Unidos, por mencionar algunos. Stevanin y colaboradores,⁴⁹ informaron que SCA7 posiblemente tenga diferentes orígenes, pues al analizar individuos portadores con la mutación de SCA7 originarios de diversas poblaciones (Asiáticas, Africanas, Anglosajonas y Europeas), reportaron que todos ellos presentan un haplotipo diferente entre sí.^{50,51}

Como se mencionó anteriormente, la alta frecuencia de SCA7 en nuestro país podría explicarse por la presencia de un efecto fundador, ya que la región geográfica afectada se localiza en una zona que por muchos años fue inaccesible, además de los aspectos culturales que propiciaron posiblemente casamientos consanguíneos.³² El fenómeno conocido como efecto fundador, se origina cuando una pequeña población es descendiente de solamente unos pocos individuos, el cual se caracteriza por tener una población endogámica o exogámica, es decir tener un déficit de heterocigotos o un exceso de heterocigotos, respectivamente.⁵⁰ Sin embargo en poblaciones humanas el fenómeno efecto fundador sobresale cuando está presente un desorden genético en una población endogámica o en una población aislada, de manera que resulta interesante poder determinar el origen de dicho fenómeno, mediante un análisis de haplotipos basados en la utilización de marcadores moleculares.⁵³

2.5 Marcadores moleculares

En la actualidad, los marcadores de ADN son herramientas muy importantes en la era de la medicina genómica. Es importante señalar que los marcadores genéticos deben ser polimórficos, esta singularidad nos permite utilizarlos para poder discriminar a un individuo de otro genéticamente. La mayoría de los marcadores moleculares se encuentran en secuencias de ADN no codificantes, se clasifican en dominantes y codominantes, la diferencia radica principalmente en que un marcador codominante puede distinguir claramente a un individuo heterocigoto mientras que con un marcador dominante es imposible distinguirlo. El tipo de herencia puede ser bi-parental (cada cromosoma es heredado por ambos progenitores) o pueden tener una herencia uni-parental, donde en el caso de los humanos es transmitido ya sea por herencia materna mediante el ADN mitocondrial o paterna mediante el cromosoma Y para el caso de los varones.^{53,54,55}

Las variaciones genéticas a lo largo del genoma que pueden ser utilizadas como marcadores genéticos son muy diversas en tanto a su estructura como en su longitud, a continuación se definen de manera general las diferentes variantes genéticas que se han utilizado como marcadores moleculares:

- a) Elementos genéticos móviles o transponibles; se definen como secuencias repetitivas de ADN que varían entre unos cientos de nucleótidos hasta una longitud en un orden de magnitud de kilobases (Kb), además tienen la capacidad para transportarse a diferentes sitios dentro del genoma. Actualmente se clasifican en dos grandes familias en base a su mecanismo de transposición:^{55,57}
 - Clase I; Retrotransposones o retroelementos, los cuales requieren una enzima que tenga la capacidad de sintetizar ADN a partir de un ARN (transcriptasa inversa).^{56,57} En el genoma humano los elementos LINE-1 y las secuencias Alu representan más del 40% de todos los elementos genéticos móviles y aproximadamente 19% del genoma humano.^{57,58}
 - Clase II; Transposones, que a diferencia de los retroelementos, no necesitan de una transcriptasa inversa sino de una enzima del tipo transposasa.^{56,57}
- b) Variación en el número de copias (CNVs), se definen como segmentos de ADN de al menos 1,000 pb que son variables en comparación con un genoma de referencia; dentro de esta definición encontramos a las inserciones, deleciones y duplicaciones.

El término CNVs no incluye aquellas inserciones o deleciones provocados por elementos transposables. En un inicio se pensaba que solamente los CNVs se relacionaban con desórdenes genéticos, actualmente se sabe que pueden ser altamente variables en la población general.^{59,60,61}

- Minisatélites o VNTR (Variable Nucleotide Tandem Repeat) son secuencias variables que se repiten en tandem en un locus definido, el tamaño de la secuencia va desde los 7 hasta 100 pb y por lo general son secuencias estables, se han encontrado alelos con nuevas mutaciones en algunos loci. Además se localizan principalmente en las regiones subteloméricas de los cromosomas, dando como resultado la desventaja de que no se encuentran distribuidos en todo el genoma, lo cual limita su utilidad.^{62,63}
- Microsatélites o SRTs (Single Repeat Trinucleotide), son repeticiones que van desde 1 a 6 nucleótidos organizados en tandem, como su nombre lo indica son secuencias más cortas que los minisatélites, se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma, representando cerca del 3% del mismo, además son polimorfismos hipervariables por lo que estas y la anterior característica hacen que sean muy utilizados en análisis de eventos demográficos (migración, expansión/contracción poblacional), estudios de mapeo en genomas y estudios forenses, entre otros. Estas repeticiones se pueden encontrar en regiones codificantes y no codificantes, de manera que pueden ser clasificados como perfectos, imperfectos y compuestos (Ver Tabla 2, pág. 7).^{63,64} Por otra parte se han establecido algunos modelos mutacionales para explicar un poco la hipervariabilidad que presentan los microsatélites, como:
 - Modelo de alelos infinitos; especifica que cada nueva mutación produce un nuevo alelo, y todas las mutaciones son igualmente probables.⁶⁵
 - Modelo de mutaciones paso a paso; indica que las mutaciones solo generarán ganancia o pérdida de una unidad de repetición y que existe la misma probabilidad de aumento o disminución del número de repetidos.⁶⁵
 - Modelo de dos fases; indica que existe la misma probabilidad de que una mutación aumente o disminuya el tamaño de una microsatélite en una o más unidades de repetición.⁶⁵

- Polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Son pequeñas variaciones que ocurren dentro de la secuencia de ADN de un individuo, es decir, es el cambio de un solo nucleótido como por ejemplo el remplazo de una Adenina (A) por cualquiera de los tres nucleótidos restantes Citosina (C), Guanina (G) o Tiamina (T). Los SNPs representan cerca del 90% de la variación existente dentro de la secuencia del ADN humano, se presentan cada 100 a 300 bases, por lo que se estima que hay más de dos millones de SNPs a lo largo del genoma humano, donde el remplazo más común es el de C, por T que ocurre cada dos de tres SNPs. De igual manera que los microsatélites, la importancia que los encontremos distribuidos en todo el genoma y su estabilidad permiten que sean usados en estudios de asociación, estudios demográficos, en estudios de ligamiento dentro de familias, desequilibrios de ligamiento en poblaciones aisladas, etc. Además su detección es más práctica pues se basa en la hibridación de oligonucleótidos con la secuencia complementaria al ADN, por lo que no se necesita realizar una electroforesis, sino simplemente una reacción de PCR tiempo real.^{66,67}

2.5.1 Marcadores genéticos para el estudio de ligamiento con SCA7

En las regiones adyacentes al gen *ATXN7* se encuentra una zona polimórfica de repetidos CA/GT, la cual forma parte de varios marcadores genéticos que son utilizados para estudios de segregación con la mutación de SCA7.¹ En un principio la identificación de marcadores informativos en el gen *ATXN7* se realizó a lo largo de regiones de más de 30 centi-Morgan (cM), sin embargo su búsqueda se redujo a no más de 20 cM. Conforme al mapeo de este locus (Figura 8) se definió que la región que va del marcador D3S1600 al marcador D3S3635 estaba en desequilibrio de ligamiento, lo que ayudó a identificar diversos marcadores de tipo STR que pudieran estar asociados a la presencia de la mutación.^{70,71} De manera independiente, dos grupos de investigación liderados respectivamente por Brice (1999) y Holmberg (2000), informaron la construcción de haplotipos de diversos marcadores moleculares con el objetivo de determinar los diferentes orígenes de SCA7.^{49,50}

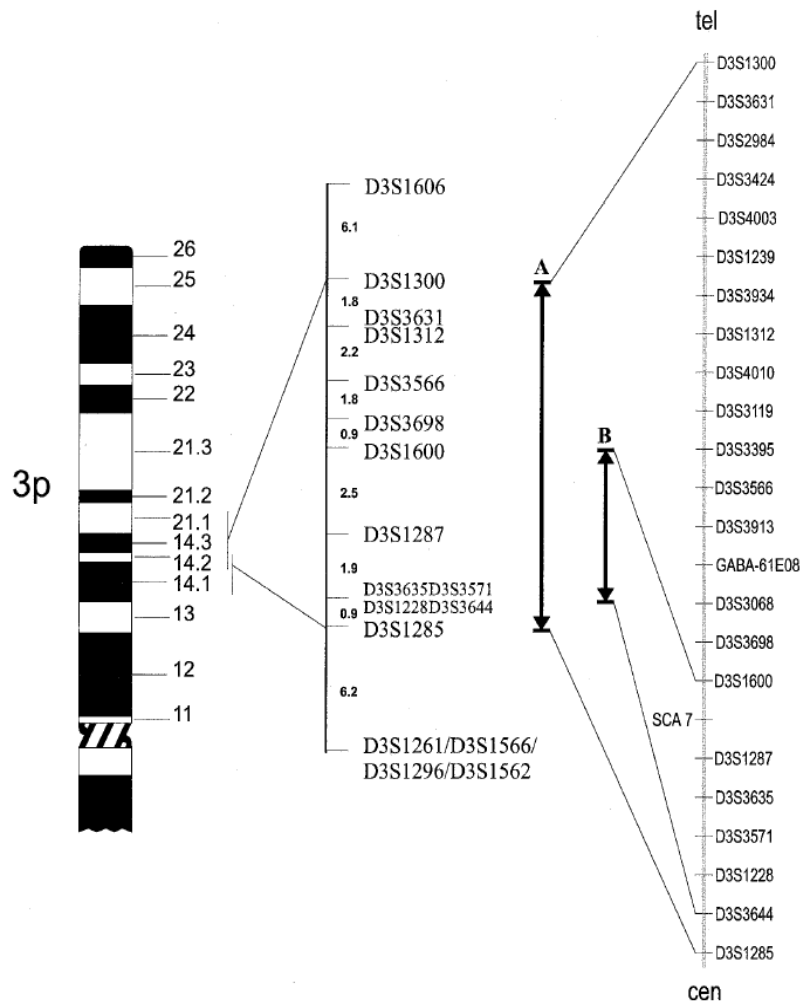


Figura 8. Localización genética de la región de SCA7. (A) Marcadores ocupando una distancia de más de 30 cM, (B) STR localizados a menos de 20 cM. ⁶⁸

Los marcadores microsatélite D3S1287, D3S3635 y D3S1228 son los más consistentes, estos presentan la característica de ser marcadores centroméricos, como se presenta en la figura 8, abarcan una distancia genética de no más de 5 cM, sus repetidos son representados por el dinucleótido CA. Además de estos marcadores microsatélites también se ha identificado un marcador tipo SNP dentro del gen *ATXN7* que segrega de manera dependiente con la expansión de repetidos CAG; el cual es un cambio de una Guanina por una Adenina ($G^{3145}TG/A^{3145}TG$) y se encuentra identificado como rs3774729. En 1999 Stevanin y colaboradores,⁴⁹ asignó la presencia de una “G” como alelo A y en contraparte la presencia de una “A” como alelo B. Este polimorfismo al encontrarse en una región codificante modifica el marco de lectura del aminoácido 862 según sea el caso, cuando se tiene el alelo A (GTG) se forma el codón que codifica para una valina, mientras que el alelo B (ATG) en esta posición que corresponde al de ataxina 7, codifica para el

aminoácido metionina. ^{47,50,69,70} En la tabla 5 pueden apreciarse los haplotipos conformados y ligados a la presencia de SCA7 en diferentes poblaciones.

Tabla 5. Haplotipos de Familias de SCA7 de diferentes orígenes geográficos, usando los marcadores descritos en el texto. ^{47,50}

Origen Geográfico	País	G3145TG/A314G	D3S1287	D3S3635	D3S1228
Asia	Corea	A	2	4	---
Norte de África	Marruecos	A	3	6	---
Anglo-Sajones	USA	A	4	6	---
Eur. Continental	Francia	B	3	6	---
Eur. Continental	Alemania	A	5	10	---
Europa del Norte	Finlandia /Suecia	A	3	5	10

2.6 Genética de poblaciones

La variabilidad genética entre un individuo o entre diversas poblaciones está dada por las diferencias que existen dentro del genoma de cada especie. Las características genéticas individuales determinan distintos rasgos que pueden ser transmitidos de padres a hijos, así mismo la transmisión de las variaciones neutras pueden formar parte del transfondo genético de un individuo o un mismo grupo. Estas variantes genéticas con el paso del tiempo y por factores ambientales pueden ser influenciadas por fuerzas evolutivas tales como migración, sucesos reproductivos, mutación, deriva génica, flujo génico y selección natural. Por lo tanto, el desarrollo de una disciplina como la genética de poblaciones es necesaria para cuantificar la variabilidad genética a través del tiempo, así como para determinar los parámetros característicos de un genoma y su comparación con otros individuos, poblaciones, o especies. ^{51, 61}

Con ayuda de marcadores moleculares la genética de poblaciones puede medir la variabilidad genética intra e inter poblacional, para ello es necesario realizar inferencias estadísticas que nos permitan analizar nuestros resultados, así como conocer algunos aspectos fundamentales de la genética de poblaciones.

La manera en que la genética de poblaciones mide la variación genética es por medio de frecuencias alélicas, que se definen como la proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población. Generalmente se reporta en porcentaje y se determina sumando el número de

alelos homólogos entre el número total de cromosomas analizados. La combinación de dos alelos nos da como resultado un genotipo, por lo que las frecuencias alélicas repercuten en las frecuencias genotípicas las cuales se definen como la proporción o porcentaje de individuos de cada genotipo para un carácter, presentes en una población.⁷²

Se dice que un individuo es homocigoto cuando los dos alelos presentes en el genotipo son iguales, mientras que un heterocigoto se presenta cuando los alelos son diferentes, la heterocigosidad esperada (H_e) es la probabilidad de que dos alelos cualesquiera escogidos al azar en la población sean diferentes entre sí.^{72,73}

Cuando las fuerzas evolutivas no actúan en una población, las frecuencias alélicas y por lo tanto las frecuencias genotípicas se mantienen constantes a través de las generaciones, entonces se dice que dicha población es ideal, esto es basado en el principio de Hardy Weinberg postulado en 1908. En el caso de un locus con dos alelos codominantes cuyas frecuencias alélicas sean A_1 y A_2 en una población bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg², la frecuencia de equilibrio está dada por:

Dónde:

$$\begin{array}{ccc}
 A_1A_1 & A_1A_2 & A_2A_2 \\
 p^2 & pq & q^2 \\
 (p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2
 \end{array}$$

Este principio permite conocer si las frecuencias genotípicas esperadas y las observadas presentan una diferencia significativa, en cuyo caso se concluye que la población se encuentra en desequilibrio con el principio. El desequilibrio del principio de Hardy-Weinberg señala la pérdida de la homogeneidad en la población, causada por fuerzas evolutivas mencionadas anteriormente como flujo génico (mezcla de poblaciones), migración, sucesos reproductivos, mutación, deriva génica.^{51,73}

El flujo genético es un factor importante porque contribuye a que una población pierda su homogeneidad lo que puede provocar que haya una subestructuración poblacional. Existen estadísticos de F que describen la estructura genética que presentan las poblaciones de individuos diploides:^{70,74}

- F_{IS} : Correlación entre alelos homólogos en los individuos con referencia a la población local. Sus valores van de $0 < F_{IS}$, cuando se presenta un exceso de heterocigotos y $F_{IS} > 0$ cuando hay un exceso de homocigotos, debido a esto, este índice de fijación pueden interpretarse como la desviación de las frecuencias genotípicas esperadas en Hardy-Weinberg dentro de la población local.
- F_{ST} : se interpreta como la varianza de la frecuencia alélica entre poblaciones, estandarizada al valor máximo posible dada la media observada de frecuencias alélicas.

Por otro lado, un parámetro de genética poblacional que determina si un marcador molecular o un grupo de marcadores es polimórfico y puede ayudar a distinguir a un individuo de otro es “la probabilidad de coincidencia al azar” que se refiere a la probabilidad de que dos individuos de una población tomados al azar tengan el mismo patrón genético, es decir, que muestren el mismo haplotipo del conjunto de marcadores analizados. La probabilidad de coincidencia al azar global para un sistema de identificación depende del número de marcadores utilizados y se calcula multiplicando la PCA de cada uno de los marcadores; entre mayor sea el número de marcadores menor será la PCA.⁷⁴

Es fundamental utilizar a la genética de poblaciones como una herramienta confiable para analizar el comportamiento de diferentes variaciones genéticas en un individuo o en grupos poblacionales, por lo que será importante en el análisis del presente proyecto, ya que se pretende visualizar el origen de la mutación de SCA7 en nuestra población mexicana.

3. Planteamiento del problema

Establecer sí la mutación de SCA7 tiene un origen común mediante el análisis de haplotipos de marcadores ligados al gen de SCA7.

4. Justificación

La atención requerida por los pacientes con SCA7 repercute tanto en la economía de las familias como la del estado de Veracruz, ya que por cada familia de un paciente índice pueden presentarse varios miembros afectados y muchos de ellos presentan la patología en la edad productiva, por lo que es importante determinar sí la alta frecuencia de SCA7 es exclusiva de esta región o pudiera extrapolarse a nivel nacional, esto ayudará a aportar

evidencia para que a corto plazo se lleven a cabo programas de salud para el manejo de los pacientes, así como un tratamiento integral de esta patología ayudando a la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

5. Hipótesis

Sí la patología presenta un origen común entonces el haplotipo conformado por los marcadores rs3774729, D3S1287, D3S3635 y D3S1228 va a ser el mismo en todos los portadores de SCA7.

6. Objetivos

Objetivo General

- ▶ **Determinar sí todos los pacientes de SCA7 en la región central del estado de Veracruz presentan un origen común.**

Objetivos Particulares

- ▶ Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de 3 marcadores microsatélite (D3S1287, D3S3635, D3S1228,) y un marcador SNP ($G^{3145}TG/A^{3145}TG$) en individuos portadores de la mutación de SCA7.
- ▶ Validar las frecuencias alélicas y genotípicas de 3 marcadores microsatélite (D3S1287, D3S3635, D3S1228) y un marcador SNP ($G^{3145}TG/A^{3145}TG$) en un grupo control, una población sana mestizo mexicana y en los familiares sanos de los individuos portadores de SCA7.
- ▶ Comparar las frecuencias haplotípicas de los diversos marcadores ligados a la mutación de SCA7 entre un grupo de individuos portadores de SCA7 en comparación de un grupo control, en los familiares sanos de los portadores de SCA7 y de la población sana mestizo mexicana.
- ▶ Determinar el Desequilibrio de Ligamiento entre estos marcadores y la presencia de la expansión anormal de tripletes repetidos CAG en el gen *ATXN7*.
- ▶ Analizar el comportamiento de cada marcador de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg y diversos parámetros de genética de poblaciones.

7. Metodología

7.1 Individuos de estudio

Para el presente estudio se analizaron 514 individuos conformados por tres diferentes grupos: a) un grupo de individuos portadores de SCA7, b) un grupo de individuos sanos de la región central de Veracruz (grupo control), c) un grupo de familiares sanos de los individuos portadores de SCA7, d) un grupo de la población sana mestizo mexicana. Todos los individuos de estudios fueron previamente diagnosticados para determinar la mutación de SCA7, a través del estudio molecular realizado en el laboratorio de medicina genómica del departamento de genética en el INR³⁰

7.1.1 Portadores de la mutación de SCA7

Todos los sujetos de estudio para este grupo fueron seleccionados de 5 comunidades pertenecientes a la región centro del Estado de Veracruz, en un área de alrededor de 1,400 km² (Figura 4), que de manera voluntaria hayan aceptado su participación en el estudio y que hayan firmado una carta de consentimiento informado (ver anexo 1).³⁰

-Criterios de Inclusión: individuos diagnosticados molecularmente con SCA7.

-Criterios de exclusión: individuos negativos en el diagnóstico de SCA7. Todos aquellos pacientes con ataxia adquirida, por ejemplo alcoholismo.

Criterios de eliminación: Todos aquellos casos en los cuales no sea posible realizar el 100 % de los procesos moleculares requeridos en la investigación.

7.1.2 Grupo control

Grupo conformado por 74 individuos no relacionados entre sí, pertenecientes a la zona centro del Estado de Veracruz (Comunidad de Tlaltetela).

-Criterios de Inclusión: individuos que no presenten SCA7 y que no tengan ningún parentesco en al menos tres generaciones con los portadores de SCA7.

-Criterios de exclusión: individuos positivos en el diagnóstico de SCA7, o que presenten parentesco con los portadores de SCA7. Cualquier individuo con diagnóstico de enfermedad neurológica o neuromuscular.

Criterios de eliminación: Todos aquellos casos en los cuales no sea posible realizar el 100 % de los procesos moleculares requeridos en la investigación.

7.1.3 Familiares sanos de los portadores de SCA7

Grupo conformado por 69 familiares sanos diagnosticados previamente a través del estudio molecular para la mutación de SCA7.

-Criterios de Inclusión: individuos diagnosticados negativamente con SCA7 y que sean familiares de los portadores de SCA7.

-Criterios de exclusión: individuos positivos en el diagnóstico de SCA7. Cualquier individuo con diagnóstico de enfermedad neurológica o neuromuscular.

Criterios de eliminación: Todos aquellos casos en los cuales no sea posible realizar el 100 % de los procesos moleculares requeridos en la investigación.

7.1.4 Población sana mestiza mexicana.

Grupo conformado por 300 individuos, mexicanos por nacimiento no relacionados entre sí, los cuales cuenten con una historia familiar, de por lo menos tres generaciones establecidas en México y que voluntariamente accedieron a participar en el estudio mediante una carta de consentimiento informado, éstos cumplían con los siguientes requisitos:

-Criterios de Inclusión: individuos que no presenten SCA7, que tengan los dos apellidos hispanos, con grupo sanguíneo O y Rh positivo.

-Criterios de exclusión: individuos con algún apellido extranjero en sus tres generaciones anteriores o con grupo sanguíneo A, B, AB y factor Rh negativo.

Criterios de eliminación: Todos aquellos casos en los cuales no sea posible realizar el 100 % de los procesos moleculares requeridos en la investigación.

7.2 Determinación de variables operativas.

7.2.1 Extracción de ADN

La recolección de muestras de sangre para los grupos de portadores de SCA7, controles y familiares, se llevó a cabo mediante un muestreo en el centro del estado de Veracruz

realizado por nuestro grupo de trabajo del laboratorio de medicina genómica del departamento de genética en el INR. Se obtuvieron 5 ml de sangre venosa periférica de cada individuo a estudiar, se recolectaron en un tubo Vacutainer empleando EDTA (*Del inglés EthyleneDiamineTetraacetic Acid*) como anticoagulante. Se realizó la extracción de ADN a partir de los leucocitos de sangre periférica a través del kit de purificación GENTRA PUREGENE (Qiagen, Duesseldorf, Germany), siguiendo el procedimiento:

1. Las muestras se centrifugaron a 151 x g por 10 minutos.
2. Se aisló la fase de los leucocitos (localizada entre los eritrocitos y el plasma) y se colocaron en un tubo de 1.5 ml.
3. Se adicionaron 750 µl de solución lisis de células rojas RBC (Red Blood Cells) mezclando con ayuda de un vórtex.
4. Se centrifugó a 1240 x g durante 30 segundos.
5. Se decantó el sobrenadante evitando eliminar el botón.
6. Al pellet se le adicionaron nuevamente 750 µl de solución lisis de células rojas RBC, se mezcló con ayuda de un vórtex aproximadamente 15 segundos.
7. Se decantó el sobrenadante evitando eliminar el pellet o botón.
8. El pellet se re suspendió con 500 µl de solución de lisis de células blancas CLS (Cell Lysis Solution), se mezcló con ayuda de un vórtex aproximadamente 15 segundos.
9. Se incubó a 37°C por 24 horas.
10. Se adicionaron 150 µl de Puregene Proteinase K mezclando con ayuda de un vórtex.
11. La mezcla se centrifugó a 14104 x g por 4 minutos.
12. Se recolectó el sobrenadante y se le adicionó un volumen de isopropanol a una temperatura de 4°C, al mezclar manualmente se pudieron observar las fibras de ADN.
13. Se centrifugó a 14104 x g durante 4 minutos.
14. Se decantó el isopropanol, quedando únicamente el botón blanco (ADN).

15. Se agregaron 500 μl de etanol al 70% y se centrifugó a 14104 x g durante 4 minutos, repitiendo este paso no menos de 2 veces.

16. Posteriormente se hidrató el ADN, manteniéndolo incubado a 37°C por 12 horas.

Para corroborar que el ADN extraído se encontraba en buenas condiciones, se realizaron geles de agarosa al 0.8% trabajo realizado en el laboratorio de medicina genómica del departamento de genética en el INR. Para las muestras de los individuos pertenecientes al grupo de la población sana mestizo mexicana se utilizó un banco de ADN del laboratorio de medicina genómica del departamento de genética en el INR.

7.2.2 Cuantificación de ADN

Una vez hidratado el ADN se llevó a cabo su cuantificación por el método espectrofotométrico empleando un NanoDrop de la marca ThermoScientific. La pureza de ADN es determinada por el cociente de las absorbancias de 260nm y 280nm. Con la cuantificación del ADN se prepararon diluciones a una concentración de $12.5 \frac{\text{ngDNA}}{\mu\text{L}}$

Concentración	$1DO_{260} = 50 \frac{\text{ngDNA}}{\mu\text{L}}$
Pureza (1.7 - 1.9)	$Pureza = \frac{A_{260}}{A_{280}}$

7.2.3 Diagnóstico molecular de SCA7.

El diagnóstico molecular de SCA7 para todos los grupos estudiados, se realizó en nuestro grupo de trabajo en el laboratorio de medicina genómica del departamento de genética en el INR mediante una reacción múltiple la cual incluye 5 ataxias autosómicas dominantes; SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 y SCA7. Actualmente el diagnóstico molecular se realiza mediante una PCR seguido de una electroforesis capilar, lo que asegura una cuantificación exacta del número de repetidos CAG. ²⁹

7.3 Marcadores microsatélite ligados a la mutación de SCA7.

7.3.1 Amplificación mediante PCR en punto final.

La amplificación de los marcadores moleculares tipo microsatélite se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) punto final empleando un

Termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando oligonucleótidos reviamente descritos (Tabla 6). Cada extremo 5' de los primers forward fueron marcados con el fluorocromo Carboxifluoresceina (6-FAM) para poder distinguir y analizar cada uno de los amplicones mediante electroforesis capilar.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 6 µL. En la Tabla 7 se muestra el contenido de cada reacción que fue estandarizada para cada uno de los tres marcadores microsatélite. Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, en una hibridación de los cebadores a 55°C, y en una extensión del cebador a los 72°C, y un ciclo final a 72°C por 5 minutos (Figura 9). Se optimizó la reacción PCR añadiendo dimetilsulfoxido (DMSO) en cual actúa como un agente potenciador de la PCR aumentando la especificidad de la reacción mediante una óptima separación de las hebras de ADN^{73,74}

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos.

Locus	STR	Tamaño del amplicón	Secuencia	Referencia
D3S1228	(CA) _n	86 pb	5'TCCTTAACTCTTTCTCTGTGAGTTG 3'	48
			5'TCCTTCCTAATCCCTTTCCTACA 3'	
D3S1287	(CA) _n	259 pb	5'ATAACACAACAAGCAAGCCTATGGT 3'	47
			5'CAAAGGGGCAAATGTCACTC 3'	
D3S3635	(CA) _n	110 pb	5'TCTATTTCTAGGAATTCATTTTCCA 3'	47
			5'TTGCTAAAACCTGGCTATGCA 3'	

Tabla 7. Condiciones de la Amplificación por PCR punto final.

Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
D3S1228 Fw	0.35 µmol/L	D3S1287 Fw	0.84 µmol/L	D3S3635 Fw	0.6 µmol/L
D3S1228 Rw	0.35 µmol/L	D3S1287 Rw	0.84 µmol/L	D3S3635 Rw	0.6 µmol/L
dNTPs	150 µmol/L	dNTPs	200 µmol/L	dNTPs	150 µmol/L
Buffer	1X	Buffer	1X	Buffer	1X
MgCl ₂	1.7 mM	MgCl ₂	1.7 mM	MgCl ₂	1.5 mM
DMSO	-----	DMSO	0.5x	DMSO	0.5x
Taq	0.5 U	Taq	0.5 U	Taq	0.5 U
ADN	2.5 ng/ul	ADN	2.5 ng/ul	ADN	2.5 ng/ul

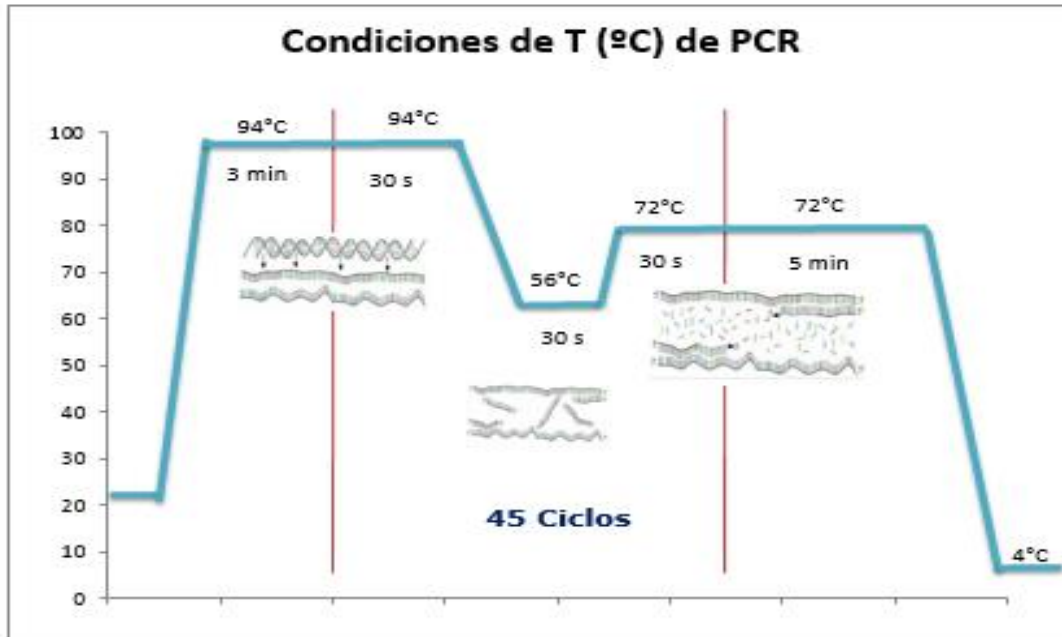


Figura 9. Condiciones de Temperatura de PCR. La PCR consta de tres temperaturas: en primer lugar se tiene una temperatura de desnaturalización con un valor de 94°C la cual se encarga de separar a la hélice de ADN para permitir que los oligonucleótidos se hibriden a cada una de las hebras, esta es llamada temperatura de alineación y tiene un valor aproximado en los 55°C, finalmente se tiene una temperatura de extensión cercana a los 72°C en este paso se efectúa la polimerización a cargo de la enzima *Thermus Aquaticus* (Taq) polimerasa con ayuda de su co-factor el $MgCl_2$ y de dNTPs. Estas tres temperaturas constituyen un ciclo, luego de varios ciclos se obtiene una gran cantidad de fragmentos de ADN.

7.3.2 Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis capilar.

Una alícuota de 1 μL del producto de reacción se mezcló con 7 μL de una solución 74:1 de formamida desionizada y marcador de peso molecular (TAMRA500- Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), se desnaturalizó elevando la temperatura a 98°C por 5 minutos y posteriormente a 4°C. El análisis de los productos de PCR y la genotipificación de los individuos se llevó a cabo mediante electroforesis capilar con un equipo ABI PRISM 310 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de 1 capilar (Tabla 8). La electroforesis capilar utiliza campos eléctricos desde 100 hasta 500 V/cm. La separación electroforética ocurre dentro de un tubo capilar de sílice diminuto con menos de 50 μm de diámetro interior, este posee una ventana óptica en donde pasa un láser argón (Ar) el cual excita a los fluorocromos que son utilizados para el marcaje de los primer forward previamente en la reacción de PCR, permitiendo el análisis de fragmentos mediante el software GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).^{74,75}

Tabla 8. Condiciones utilizadas para el análisis de fragmentos.

Condiciones de electroforesis capilar para cada muestra	
Marcador de peso molecular TAMRA 500	0.20 µL
Formamida HI-DI	7.30 µL
Producto de PCR	1.0 µL
Tiempo de corrida	24 minutos
Temperatura	60°C
Voltaje	15 kV
Polímero	POP 4
Tiempo de inyección	5 segundos

7.4 Análisis del marcador SNP ligado a la mutación de SCA7.

La amplificación del SNP se realizó mediante un sistema de PCR en tiempo real en un Termociclador StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), empleando sondas TaqMan MGB (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

La amplificación de los fragmentos en donde se encuentra localizado el polimorfismo tipo SNP es igual a las otras reacciones en las que se emplean un par de oligonucleótidos o *primers* que son complementario a la cadena molde del DNA (aproximadamente de 20pb), pero además emplean dos fragmentos de DNA de unos 10 pb ("*probe*"), llamados sondas, los cuales incorporan un reportero fluorescente o fluoróforo (*FAM* o *VIC*) y un "*quencher*" (tetrametilrodamina, *TAMRA*). Ambos fluoróforos se encuentran unidos covalentemente. El *quencher* tiene como función impedir temporalmente la emisión de la fluorescencia por su impedimento estérico con el reportero, así al existir una hibridación entre la sonda y el DNA, la exonucleasa 5'→3' de la DNA polimerasa degrada la porción del cebador que se ha alineado al templado, rompiendo el enlace con el reportero y separándolo del "*quencher*", permitiendo con ello la emisión de fluorescencia. Por su parte, si no hay una hibridación, al paso de la DNA polimerasa, la sonda se libera espontáneamente sin emisión de fluorescencia, por tanto estos cambios puede diferenciar a cada alelo a través del sistema de detección de fluorescencia de forma cuantitativa.⁴⁸

Cada Taqman Universal PCR Master mix contiene la Taq polimerasa AmpliTaq Gold, la enzima UNG Amperasa, dNTP's con dUTP, referencia pasiva, y optimizada con amortiguador y MgCl₂. Cada 20x SNP genotyping Assay mix contiene oligonucleótidos

secuencia específicos para la amplificación de la región de interés y dos sondas MGB (acopladas con un elemento que permiten que las sondas se unan a una mayor temperatura [*minor groove binder*] y un elemento silenciador o apagador de fluorescencia), una sonda alelo específica para A marcada con VIC y otro alelo específico para el cambio G marcada con FAM.

Tabla 9. Condiciones de la Amplificación por PCR tiempo real.

Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Taqman Universal PCR Master mix	5.0 mL	Agua	5.0 mL
20x SNP genotyping Assay mix	0.5 mL	ADN genómico a 12.5 ng/mL	0.5 mL

Cada reacción se realizó en un volumen de reacción de 10 μ L.

El procedimiento de amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial y activación de la Taq polimerasa a 95°C por 10 minutos, y 40 ciclos de; desnaturalización a 95°C por 15 segundos y de hibridación de cebadores así como la extensión del cebador a 60°C por 1 minuto (Figura 10).

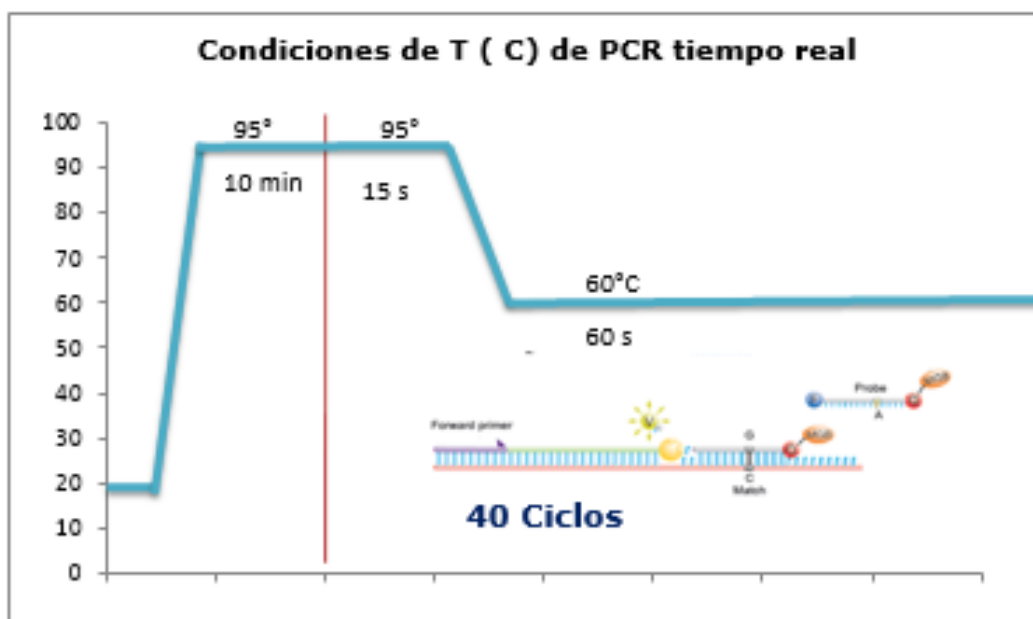


Figura 10. Condiciones de temperatura para la realización de la PCR en tiempo real.

7.5 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre los individuos portadores de SCA7 y los individuos sanos, así como también de los individuos de la población general, se realizó una prueba de chi cuadrada (χ^2) mediante una tabla

2x2. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron se calcularon con ayuda del programa GenALEx v.6.1. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado con programa Arlequín 3.1 (University of Berne, Geneva Switzerland) y confirmado con el programa GENETIX 4.01 (University of Montpellier, Montpellier, Francia). Los niveles de significancia fueron determinados empíricamente con 10,000 permutaciones. El desequilibrio de ligamiento se calculó con ayuda del programa FSTAT v. 2.9.3.2

8. Resultados

8.1 Características generales de los individuos portadores de SCA7

Los portadores de SCA7 fueron reclutados a partir de 8 diferentes familias de la zona central del Estado de Veracruz, localizados en una región que comprende 5 diferentes comunidades (Figura 4).³⁰ Se identificaron 71 individuos portadores de la expansión anormal del triplete CAG en el gen *ATXN7* trabajo realizado en el laboratorio de medicina genómica del departamento de genética en el INR^{29,30}, que se clasificaron de acuerdo a sus características clínicas en: 54 sintomáticos y 17 individuos asintomáticos.

El rango de edad de los individuos analizados se presentó entre los 11 y los 89 años de edad, con una media de edad de 32.74 ± 17.87 .^{29,30} En la figura 11, se puede observar tanto la frecuencia de los alelos normales como la de los alelos mutados en la muestra de individuos portadores de la mutación de SCA7.

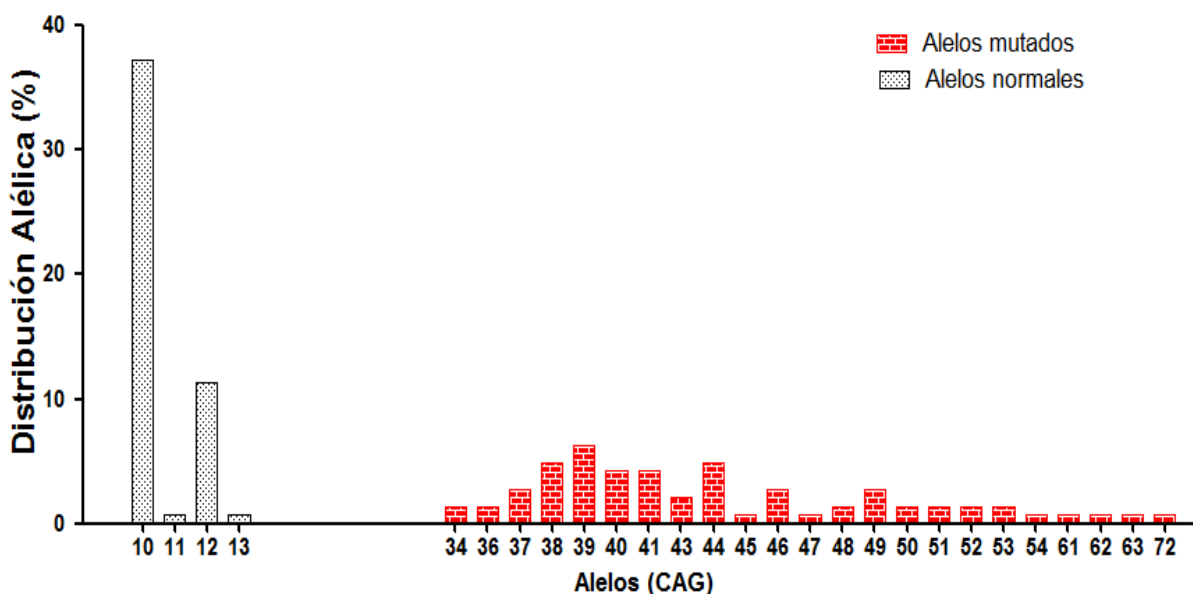


Figura 11. Distribución de los alelos presentes en los portadores con la mutación de SCA7. Se identificaron solamente 4 alelos normales, donde el alelo de 10 repetidos CAG fue el más frecuente (37 %). Las expansiones anormales del triplete CAG se presentaron en un rango de 34

hasta 72 repetidos, con una frecuencia de 6.3 % para el alelo con 39 repetidos siendo este el más frecuente.²⁹

8.2 Análisis de los marcadores microsatélites D3S1287, D3S1228 y D3S3635 a través de electroforesis capilar

La amplificación de cada marcador se realizó de manera independiente, a pesar de que su temperatura de alineamiento entre cada par de oligonucleótidos utilizados es similar, esto debido a que el oligonucleótido sentido utilizado para cada uno de los tres marcadores fue marcado con el mismo fluorocromo (FAM) y el peso esperado de cada amplicón es muy cercano, por lo que la posibilidad de solapamiento era inminente. En la Figura 12, se presentan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada marcador microsatélite dinucleótidos utilizado.

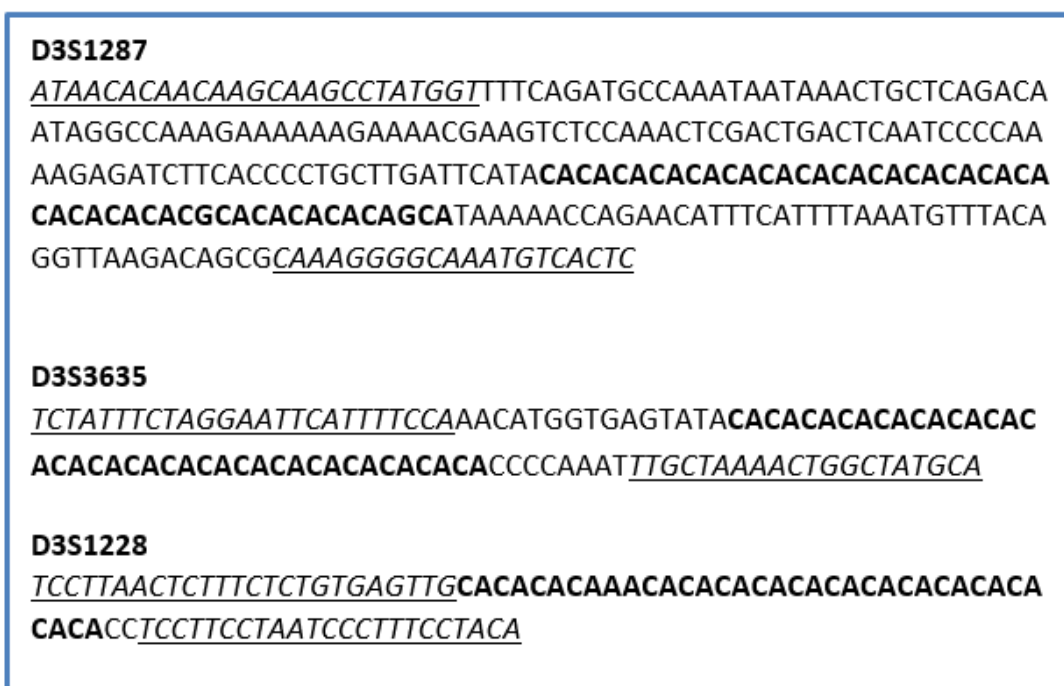


Figura 12. Secuencias de los marcadores microsatélites ligados a la expansión anormal de los repetidos CAG en el gen ATXN7. Los tres marcadores analizados se encuentran en una región de aproximadamente de 5 cM en la región adyacente al gen ATXN7. Las letras en negritas muestran la secuencia STR analizada y los nucleótidos subrayados muestran las regiones específicas para los oligonucleótidos utilizados para cada amplificación. Las regiones analizadas se confirmaron mediante el alineamiento a través de la base electrónica BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

La separación de los productos de PCR se realizó mediante una electroforesis capilar y se analizó a través del programa GeneMapperID 3.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El patrón electroforético de un individuo heterocigoto para cada marcador analizado

se muestra en la Figura 13. La asignación de los alelos se realizó de manera arbitraria de acuerdo al peso molecular que corresponde al fragmento de la secuencia de nucleótidos.

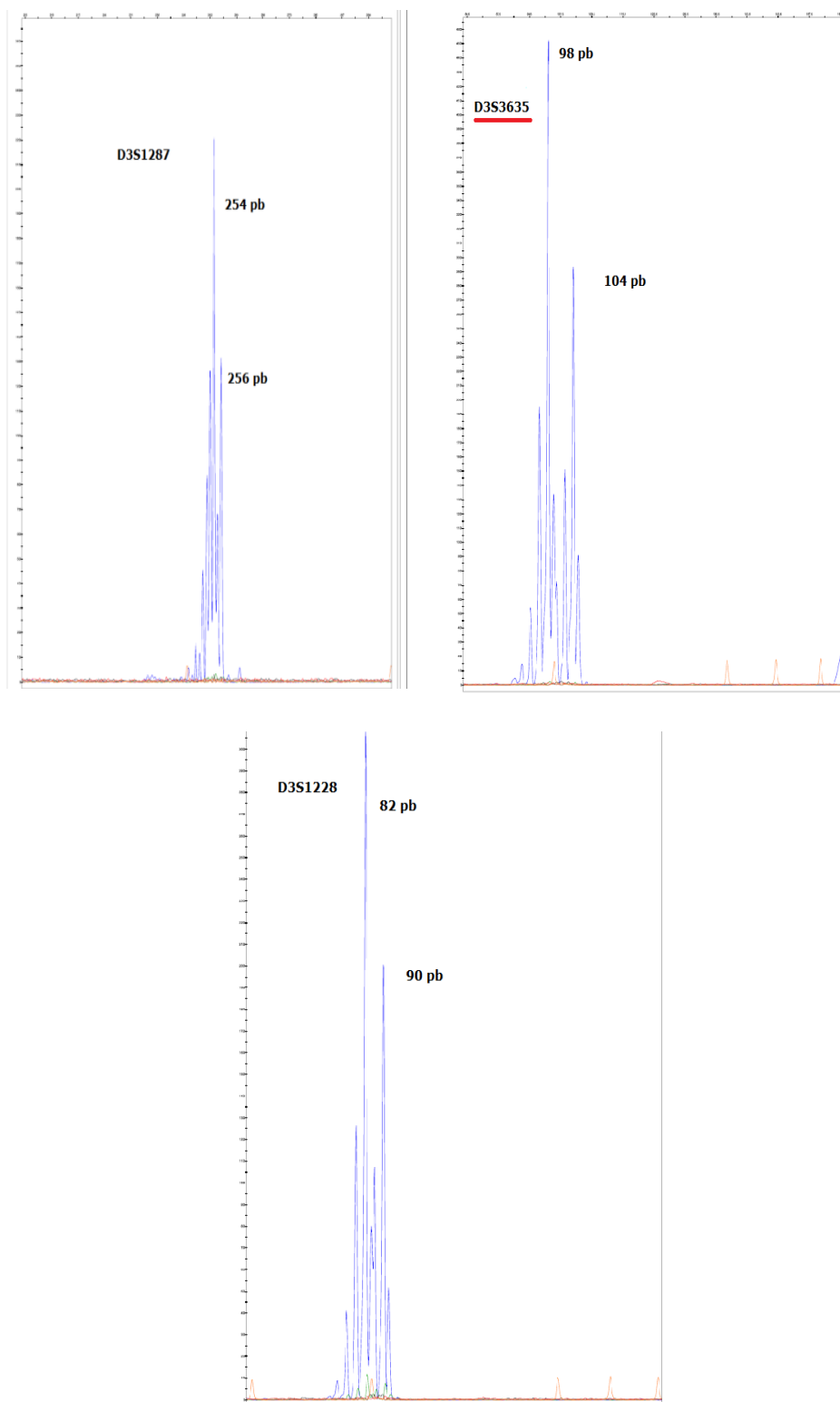


Figura 13. Electroferogramas para los marcadores D3S1287, D3S3635 y D3S1228. En el eje de las abscisas se determinó el tamaño del alelo en pares de bases, mientras que en las ordenadas se determinaron las unidades relativas de fluorescencia. En color Azul se observó la amplificación

para cada marcador, mientras en color rojo se observó el marcador de peso molecular. El patrón electroforético correspondió a un marcador dinucleótido, que se describe como un “patrón de guante o mano” debido al resbalón de la amplificación.

8.3 Frecuencias alélicas para cada marcador microsatélite

✓ Marcador microsatélite D3S1287

El marcador D3S1287 es el polimorfismo analizado más cercano al locus de SCA7. En la población sana mestizo mexicana se identificaron 9 alelos secuenciales diferentes, en un rango que corresponde de 240 hasta 258, por otro lado solamente se observaron seis alelos en el grupo de portadores de SCA7 y en sus familiares, mientras que en el grupo control se observó un alelo más llamado 240 (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia en porcentaje de los alelos obtenidos para el marcador D3S1287

Alelo	SCA 7 (n=142)	Controles (n=148)	Familiares sanos (n=138)	Pob. sana mestiza mexicana (n=600)
240	---	2,0	---	0,2
244	---	---	---	0,2
246	1,4	2,7	2,2	0,0
248	1,4	0,7	3,6	1,2
250	3,5	10,1	7,2	11,0
252	16,9	47,3	34,8	37,8
254	75,4	29,1	44,9	41,8
256	1,4	8,1	7,2	6,8
258	---	---	---	1,0

n=Número de cromosomas analizados. Los alelos que están sombreados son los que se presentaron en mayor frecuencia.

El alelo 254 es muy frecuente en el grupo de portadores de SCA7 presentando diferencias estadísticamente significativas con los otros grupos analizados (Figura 14), lo que sugiere que este podría ser el alelo ligado a la expansión anormal de tripletes CAG en el gen *ATXN7*. En contraparte los alelos 252 y 254 tienen frecuencias similares en el grupo control así como también en el grupo de población sana mestizo mexicana. El alelo 254 también es el más frecuente en el grupo de familiares sanos de los portadores de SCA7, sin embargo existen diferencias estadísticamente significativas en comparación al grupo de portadores con SCA7, lo que confirma que a pesar de ser familiares el comportamiento del alelo 254 difiere entre ambos grupos. La frecuencia de los otros alelos identificados es similar entre los 4 grupos analizados.

✓ Marcador microsatélite D3S3635

Para el locus correspondiente al marcador D3S3635, el alelo de mayor frecuencia en el grupo de portadores de SCA7 fue el alelo 98, presentando más del 60%, mientras que en los grupos restantes la frecuencia de este alelo es por debajo del 32% (Tabla 11). Estadísticamente el comportamiento para el alelo 98 del grupo con la mutación de SCA7 es totalmente diferente al observado por los grupos controles (Figura 12).

Tabla 11. Frecuencia en porcentaje de los alelos obtenidos para el marcador D3S3635

Alelo	SCA 7 (n=142)	Controles (n=148)	Familiares sanos (n=138)	Pob. sana mestiza mexicana (n=600)
92	---	0.7	---	---
94	---	---	---	0.7
96	---	---	---	0.7
98	60.6	31.1	26.8	22.2
100	8.5	10.8	11.6	15
102	8.5	21.6	15.2	28.7
104	19.7	31.8	41.3	22.5
106	2.1	4.1	3.6	8.5
108	0.7	---	1.4	1.7
110	---	---	---	0.2

n=Número de cromosomas analizados. El número de individuos analizados es igual a n/2. Los alelos que están sombreados son los que se presentaron en mayor frecuencia.

En el grupo de controles no se observó el alelo 108 el cual está presente en los portadores de SCA7 y sus familiares, así como también en la población sana mestiza mexicana, de manera opuesta el alelo 92 solamente se encuentra en el grupo de los controles, sin embargo todos estos alelos se encuentran pobremente distribuidos en la población. Aunque este marcador no es el más polimórfico, presenta el mayor número de alelos más comunes (Figura 12).

✓ Marcador microsatélite D3S1228

Este marcador fue el más polimórfico de los tres marcadores utilizados, con un total de 14 alelos encontrados en la población sana mestiza mexicana, 9 alelos en el grupo control y 7

alelos encontrados en el grupo de portadores de la mutación de SCA7 y sus familiares. De manera peculiar, al contrario de lo que sucede con el marcador D3S1287 no todos los alelos de los portadores y sus familiares coinciden, por ejemplo en los familiares aparece el alelo 68, mientras que en los portadores el alelo que aparece es el 76. Los controles presentaron dos alelos extras con respecto a los portadores y sus familiares. Es importante mencionar que el alelo 68 solo fue identificado en el grupo de familiares de SCA7.

Tabla 12. Frecuencia en porcentaje de los alelos obtenidos para el marcador D3S1228

Alelo	SCA 7 (n=142)	Controles (n=148)	Familiares sanos (n=138)	Pob. sana mestiza mexicana (n=600)
68	---	---	0,7	---
70	---	---	---	0,2
72	---	---	---	0,3
74	20,4	43,2	44,9	41,8
76	1,4	0,7	---	0,8
78	---	0,7	---	0,8
80	---	0,7	---	2,3
82	62,0	24,3	23,9	25,7
84	0,7	2,0	2,2	3,8
86	1,4	0,7	1,4	0,5
88	2,8	0,7	4,3	1,5
90	11,3	27,0	22,5	21,8
92	---	---	---	0,2
94	---	---	---	0,2

n=Número de cromosomas analizados. Los alelos que están sombreados son los que se presentaron en mayor frecuencia.

Con respecto a las frecuencias, el alelo 82 se observó más frecuente en el grupo de portadores con SCA7 a diferencia de los otros grupos analizados, lo que nos sugiere que podría tener un papel importante en el grupo de portadores.

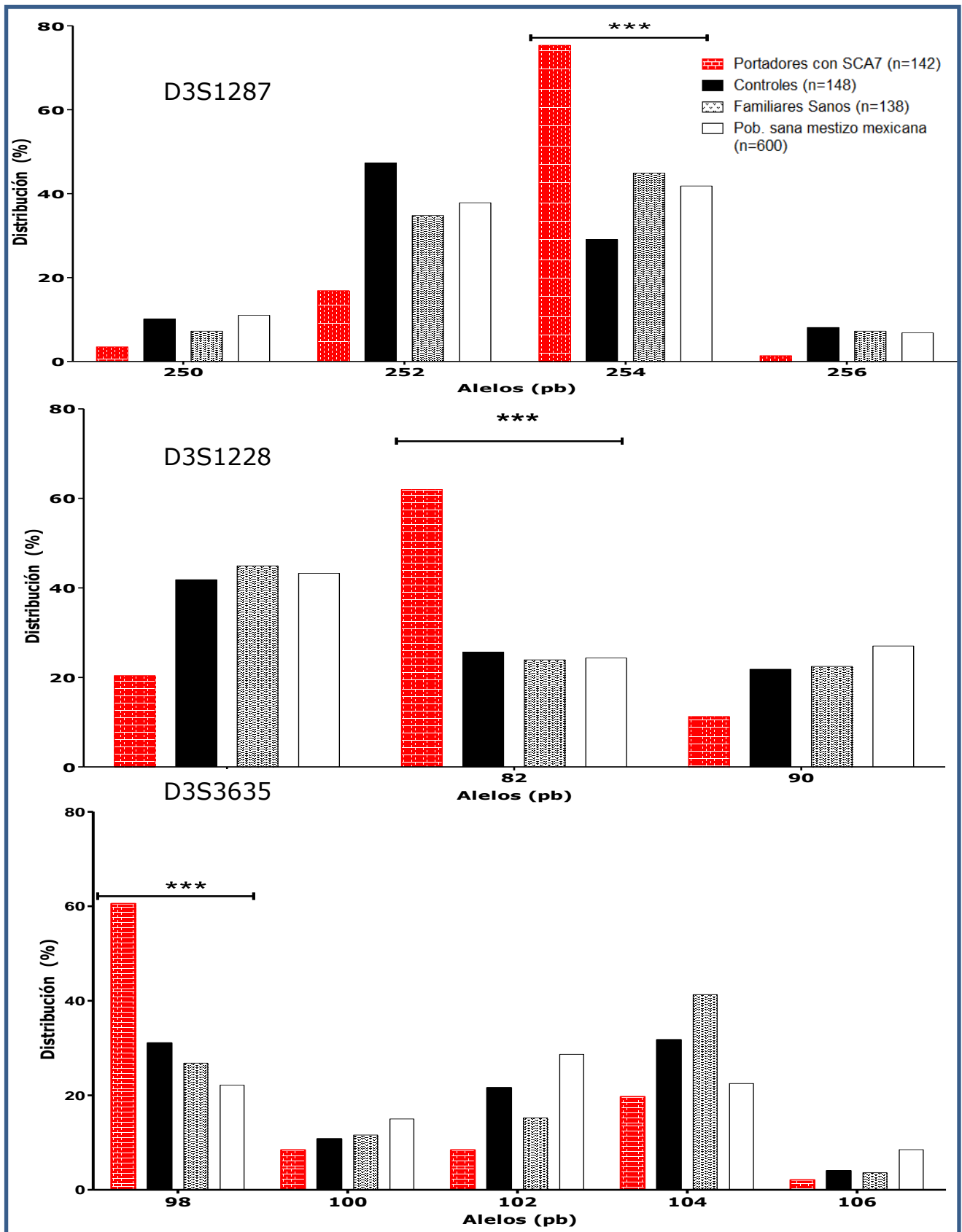


Figura 14. Distribución alélica obtenida para cada marcador microsatélite. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (***) obtenidas para los alelos correspondientes entre el grupo de portadores de SCA7 y los otros grupos analizados.

8.4 Frecuencias genotípicas para cada marcador microsatélite

Las frecuencias genotípicas nos indican el comportamiento de homocigotos y heterocigotos presentes en la población de estudio. Para cada uno de los marcadores se determinó la frecuencia de los genotipos observados, de tal forma que se pudieron ver diferencias significativas entre el grupo portador de SCA7 con los otros grupos analizados.

✓ Marcador microsatélite D3S1287

El alelo más común para el locus D3S1287 dentro del grupo de portadores fue el 254 con una frecuencia de 75.4% (Tabla 10), lo que sugiere que todos los portadores tienen al menos un alelo 254.

Tabla 13. Frecuencia en porcentaje de los genotipos obtenidos para el marcador D3S1287

Genotipos	SCA 7 (N=71)	Controles (N=74)	Familiares sanos (N=69)	Pob. sana mestiza mexicana (N=300)
240/252	---	4,1	---	---
240/254	---	---	---	0,3
244/254	---	---	---	0,3
246/250	---	1,4	---	---
246/252	---	4,1	1,4	---
246/254	2,8	---	2,9	---
248/248	---	---	---	0,3
248/250	---	---	1,4	---
248/252	---	1,4	1,4	1,0
248/254	2,8	---	4,3	0,7
250/250	---	2,7	1,4	1,0
250/252	---	8,1	2,9	11,7
250/254	7,0	4,1	7,2	5,7
250/256	---	1,4	---	2,7
252/252	---	17,6	13,0	13,0
252/254	33,8	33,8	29,0	32,0
252/256	---	8,1	8,7	5,0
254/254	50,7	8,1	20,3	19,0
254/256	2,8	4,1	5,8	4,7
254/258	---	1,4	---	2,0
256/256	---	---	---	0,7

N=Número de individuos analizados. Los genotipos que están sombreados son los que se presentaron en mayor frecuencia.

El análisis de los genotipos arrojó un gran número de homocigotos para el alelo 254, en la tabla 13 se observa que más del 50% de los portadores son homocigotos, mientras que la frecuencia de estos para los familiares es cercana al 20% al igual que en la población sana mestiza mexicana, y solamente un 8% de los individuos controles son homocigotos 254/254. De manera similar, se identificó que todos los individuos portadores de SCA7 heterocigotos para el marcador D3S1287, presentaron al menos un alelo 254. Por otra parte los heterocigotos que se comparten entre todos los grupos analizados tienen un comportamiento similar, de modo que no presentan diferencias significativas (Figura 13).

✓ Marcador microsatélite D3S3635

El genotipo homocigoto 98/98 fue más frecuente en el grupo de portadores de SCA7 (21.1%) mostrando diferencias estadísticamente significativas con el grupo de sus familiares así como también con el grupo de controles y la población sana mestiza mexicana (Figura 14). Mientras que el heterocigoto 98/104 presentó una frecuencia de casi el 40% en los portadores con SCA7. Por otra parte aquellos genotipos que no presentan el alelo 98 no pertenecen a los genotipos encontrados en el grupo de los portadores, de manera que el alelo 98 es el que está podría estar ligado a la mutación de SCA7.

Tabla 14 Frecuencia en porcentaje de los genotipos obtenidos para el marcador microsatélite D3S3635 en cada grupo analizado.

Genotipos	SCA 7 (N=71)	Controles (N=74)	Familiares sanos (N=69)	Pob. sana mestiza mexicana (n=300)
92/102	---	---	1,4	---
94/98	---	---	---	0,7
94/100	---	---	---	0,3
94/104	---	---	---	0,3
96/98	---	---	---	0,3
96/102	---	---	---	0,3
96/104	---	---	---	0,3
96/106	---	---	---	0,3
98/98	21,1	4,3	10,8	6,3
98/100	16,9	2,9	5,4	4,7
98/102	16,9	11,6	12,2	15,7
98/104	39,4	29	18,9	8,7
98/106	4,2	1,4	4,1	1,3
98/108	1,4	---	---	0,3
100/100	---	---	2,7	3
100/102	---	4,3	2,7	7

100/104	---	15,9	6,8	9,7
100/106	---	---	1,4	1
100/108	---	---	---	1,3
102/102	---	1,4	8,1	9,7
102/104	---	10,1	10,8	9
102/106	---	1,4	---	5
102/108	---	---	---	1
104/104	---	10,1	12,2	6
104/106	---	4,3	2,7	4,7
104/108	---	2,9	---	0,3
106/106	---	---	---	2
106/108	---	---	---	0,3
108/108	---	---	---	0,3

N=Número de individuos analizados. Los genotipos que están sombreados son los que se presentaron en mayor frecuencia.

✓ Marcador microsatélite D3S1228

Como se mencionó anteriormente el marcador D3S1228 fue el más polimórfico con un total de 14 alelos (Tabla 12). Al realizar el análisis de las frecuencias genotípicas se observaron 33 genotipos diferentes (Tabla 15) y conforme a lo esperado se observó que cada genotipo presente en el grupo de portadores con SCA7 presentó al menos un alelo 82 lo que dio una frecuencia de individuos homocigotos para este alelo del 23.9%, mientras que dentro de los heterocigotos el genotipo más frecuente fue 74/82.

Como se observa en la figura 13 los genotipos 74/82, 82/82 y 82/90 presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos portadores de SCA7 y los grupos restantes analizados.

Tabla 15. Frecuencia en porcentaje de los genotipos obtenidos para el marcador D3S1228

Genotipos	SCA 7 (N=71)	Controles (N=74)	Familiares sanos (N=69)	Pob. sana mestiza mexicana (N=300)
68/74	---	1,4	---	---
70/78	---	---	---	0,3
72/72	---	---	---	0,3
74/74	---	13	24,3	15,3
74/76	---	---	---	0,3
74/78	---	---	1,4	---
74/80	---	---	---	3,3
74/82	40,8	21,7	14,9	24,3
74/84	---	2,9	2,7	3,7

74/88	---	7,2	---	1,7
74/90	---	30,4	18,9	19,3
74/94	---	---	---	0,3
76/76	---	---	---	0,3
76/82	2,8	---	1,4	0,7
78/78	---	---	---	0,3
78/82	---	---	---	0,3
78/84	---	---	---	0,3
80/80	---	---	---	0,3
80/82	---	---	---	0,3
80/90	---	---	1,4	0,3
82/82	23,9	7,2	6,8	7,7
82/84	1,4	1,4	1,4	0,3
82/86	2,8	2,9	---	---
82/88	5,6	---	1,4	---
82/90	22,5	7,2	16,2	9,7
82/92	---	---	---	0,3
84/84	---	---	---	0,3
84/88	---	---	---	0,3
84/90	---	---	---	2,3
86/90	---	---	1,4	1
88/88	---	---	---	0,3
88/90	---	1,4	---	0,3
90/90	---	2,9	8,1	5,3

N=Número de individuos analizados. Los genotipos que están sombreados son los que se presentaron en mayor frecuencia.

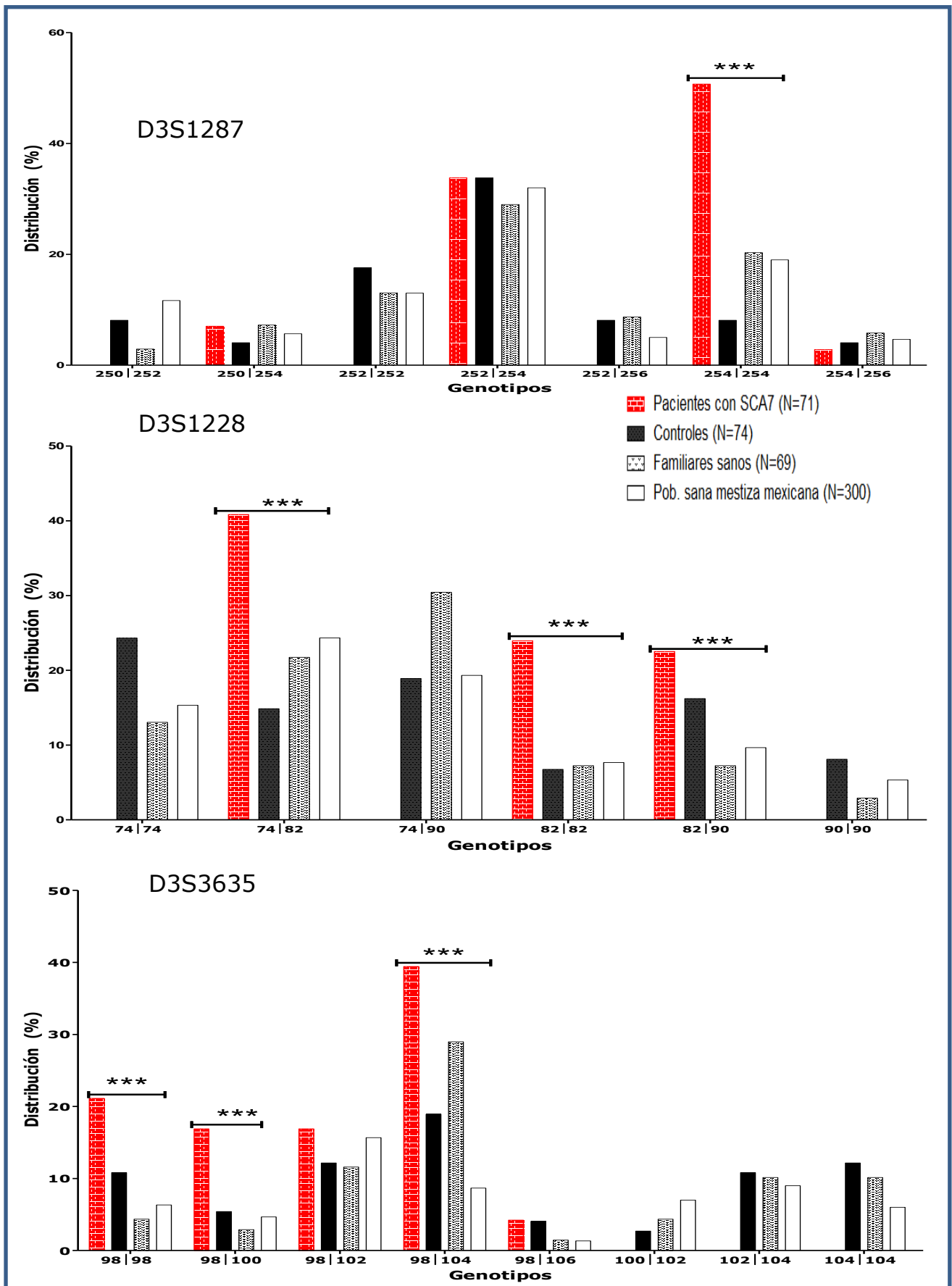


Figura 15. Distribución genotípica obtenida para cada marcador microsatélite. Se muestran las diferencias significativas (***) = $p < 0.0001$) obtenidas para los genotipos.

8.5 Frecuencias alélicas y genotípicas del marcador rs377429

El marcador rs377429 es un polimorfismo bi-alélico, el cual presenta la sustitución de una Adenina por una Guanina en la posición 3145 del gen *ATXN7*, el alelo con mayor frecuencia en el grupo de los portadores es el correspondiente al que presenta una Adenina (alelo A), el cual presenta casi un 65%, mientras que en sus familiares solamente está cercanamente a un 35%, es decir, aunque compartan características genéticas, la frecuencia de este alelo no es similar (Tabla 16). En cambio, la frecuencia de los familiares es similar con la frecuencia de los grupos control y población sana mestiza mexicana, por lo que no hay diferencias significativas entre ellos, pero sí las hay entre los portadores de SCA7 y estos tres grupos (Figura 16).

Tabla 16. Frecuencia en porcentaje de los alelos y genotipos para el polimorfismo rs377429

Frecuencias alélicas rs377429				
Alelo	SCA 7 (n=142)	Controles (n=148)	Familiares sanos (n=138)	Pob. sana mestiza mexicana (n=600)
A ³¹⁴⁵ (B*)	64,8	29,2	34,8	29,7
G ³¹⁴⁵ (A*)	35,2	70,8	65,2	70,3
Frecuencias genotípicas rs377429				
Genotipo	SCA 7 (N=71)	Controles (N=74)	Familiares sanos (N=69)	Pob. sana mestiza mexicana (n=300)
AA	29,6	5,4	14,5	9
AG	70,4	48,6	40,6	40,3
GG	0	45,9	44,9	50,7

n=Número de cromosomas analizados. El número de individuos analizados es igual a N=n/2
*Nomenclatura dada por Stevanin y colaboradores.⁴⁷

Debido a que el polimorfismo es bi-alélico el máximo de genotipos encontrados son tres (Tabla 16). En el grupo de los portadores no encontramos el genotipo GG, pero sí casi un 30% del homocigoto AA y un 70% del heterocigoto AG, lo que probablemente esté indicando que el alelo A es el que podría estar ligado a la mutación. Por el contrario, el genotipo GG se presenta casi en un 50% en controles, familiares y población sana mestiza mexicana, permaneciendo ausente en los individuos portadores de SCA7.

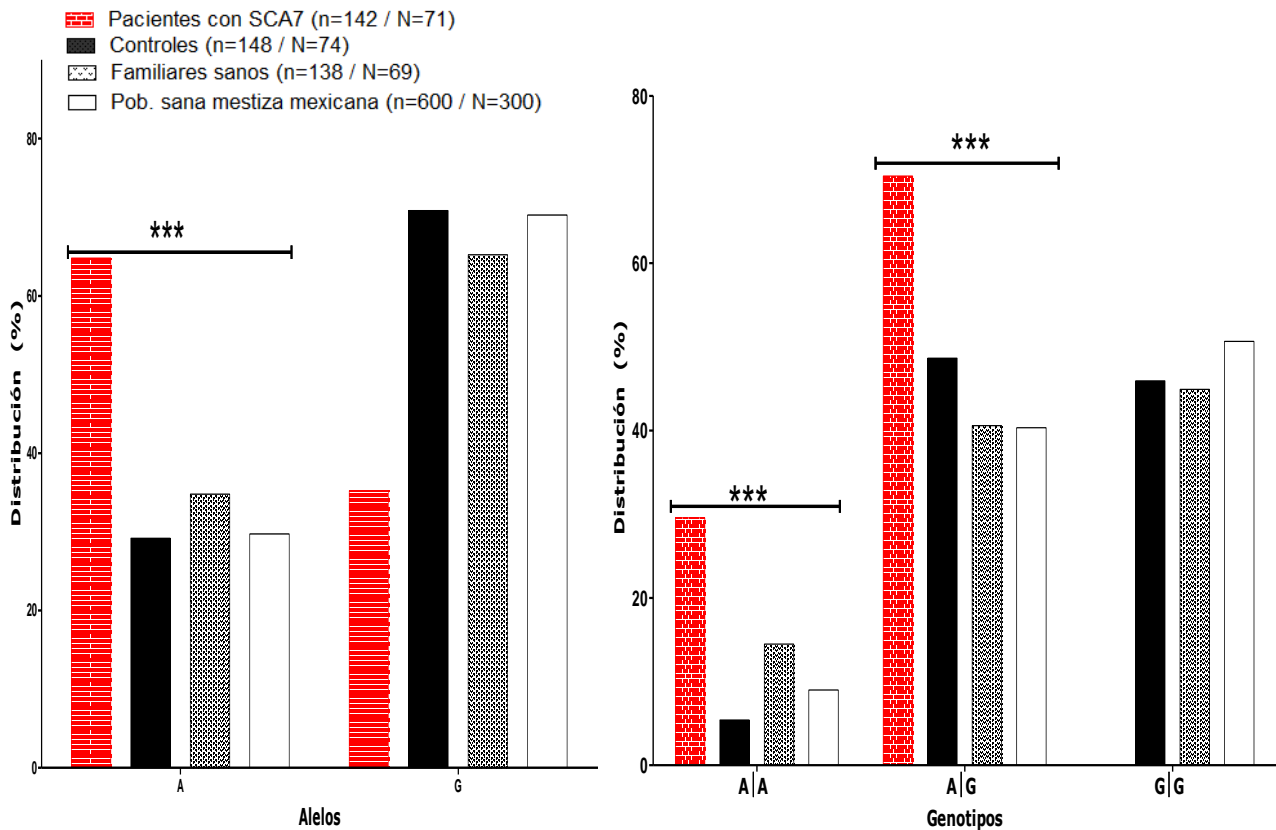


Figura 16. Distribución alélica y genotípica del Polimorfismo rs377429. Se muestran las diferencias significativas (***) obtenidas para los alelos (izquierda) y genotipos (derecha) correspondiente al marcador entre el grupo de portadores con SCA7 y los grupos controles.

8.6 Haplotipo común en los portadores con SCA7

Como hemos visto para cada uno de los polimorfismos estudiados, el comportamiento del grupo de los portadores de SCA7 es diferente en comparación con sus propios familiares, de hecho el comportamiento de los familiares es similar al grupo control que son individuos sanos no relacionados pero que representan de alguna manera a la población donde se encontraron más casos de SCA7, aunado a esto el comportamiento del grupo de controles es muy parecida al del grupo de población sana mestizo mexicana, por lo que en estos tres últimos grupos no existen diferencias estadísticamente significativas, en la tabla 17 se resumen las diferencias encontradas en cada alelo ligado a la mutación así como en los genotipos homocigotos a dicho alelo o los genotipos heterocigotos que contienen ese alelo.

Tabla 17. Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo portador de SCA7 y los grupos controles.

Alelo/ Genotipos	SCA 7 (N=71)	Controles (N=74)	P	Familiares sanos (N=69)	P	Pob. Sana mestiza mexicana (N=300)	P
rs3774729							
A	92	44	***	48	***	175	***
A A	21	4	***	10	*	27	***
A G	50	36	*	28	***	121	***
G G	0	34	***	31	***	152	***
D3S1287							
254	107	43	***	62	***	251	***
254 254	36	6	***	14	***	57	***
254 X	35	31	NS	34	NS	137	NS
X X	0	37	***	21	***	106	***
D3S3635							
98	86	46	***	37	***	133	***
98 98	15	8	NS	3	***	19	***
98 X	56	30	***	31	***	95	***
X X	0	36	***	35	**	186	***
D3S1228							
82	88	36	***	33	***	154	***
82 82	17	5	**	5	**	23	***
82 X	54	26	***	23	***	108	***
X X	0	43	***	41	***	169	***

n=Número de cromosomas analizados utilizados para la determinación de la frecuencia alélica. El número de individuos analizados es igual a $N=n/2$ utilizados para la determinación de la frecuencia genotípica. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

Las frecuencias de los alelos A, 254, 98 y 82 correspondientes a los polimorfismos rs377429, D3S1287, D3S3635 y D3S1228 respectivamente, son mayores al 50% dentro del grupo de los portadores con SCA7 cuando se analizan de manera independiente, lo significa que todos los portadores presentan al menos un alelo de los antes mencionados. Por lo tanto, se identificó la presencia de un haplotipo común para todos los portadores de SCA7 (haplotipo A-254-98-82). Es relevante mencionar que este haplotipo solamente está

presente en un 7% en los familiares sanos, mientras que en los controles y en la población sana mestiza mexicana se encuentra en un 5% y 6%, respectivamente (Figura 15).

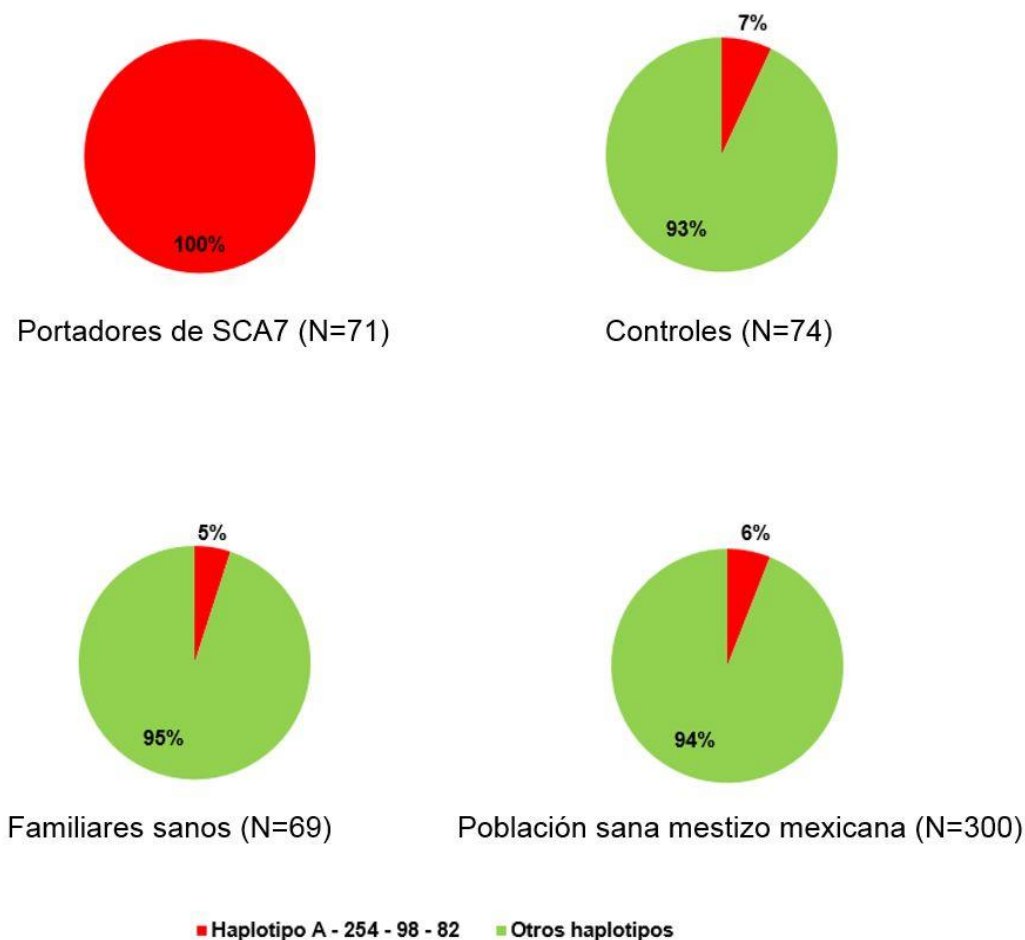


Figura 17. Frecuencia en porcentaje del haplotipo A-254-98-82

Los marcadores microsatélites utilizados en este estudio no tienen más de 15 alelos, y solamente algunos de estos alelos presentan una frecuencia mayor al 5%. Por lo que el porcentaje del haplotipo común de SCA7 encontrado en individuos sanos como es el caso de los familiares, del grupo control y de la población sana mestiza mexicana, se debe a que la probabilidad de coincidencia al azar es de $2.89E-3$, lo que significa que por cada 346 individuos 1 presenta el haplotipo común de SCA7. Para corroborar que los alelos que conforman el este haplotipo común de SCA7 si están ligados a la mutación se calculó el desequilibrio de ligamiento para estos marcadores con la expansión anormal del trinucleótido CAG en SCA7.

Tabla 18. Desequilibrio de Ligamiento.

	rs3774729 A	D3S1287 254	D3S1228 82	D3S3635 98
SCA7	*	*	*	*

* = $P < 0.05$

8.7 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada una de las poblaciones estudiadas, mediante las diferencias significativas entre los genotipos observados y los que se deberían esperar de acuerdo a las frecuencias obtenidas. En la tabla 19 se observa que solamente los grupos que presentan diferencias estadísticamente significativas son los portadores y la población sana mestiza mexicana, lo que significa que se encuentran en desequilibrio con la ley de Hardy-Weinberg. Al analizar el índice F_{IS} se determinó que existe un exceso de heterocigotos en los portadores de SCA7 y un ligero exceso de homocigotos para la población sana mestiza mexicana.

Tabla 19. Características de variabilidad genética por marcador polimórfico.

Grupo	Marcador	Ho	He	HW (p)	F_{IS}
Portadores de SCA7	D3S1228	0.76	0.56	**	-0.32
	D3S3635	0.78	0.58	***	
	D3S1287	0.49	0.40	NS	
	SNP	0.70	0.45	***	
Controles	D3S1228	0.60	0.68	NS	----
	D3S3635	0.66	0.74	NS	
	D3S1287	0.65	0.66	NS	
	SNP	0.48	0.42	NS	
Familiares sanos	D3S1228	0,76	0,69	NS	----
	D3S3635	0,84	0,72	NS	
	D3S1287	0,65	0,66	NS	
	SNP	0,4	0,45	NS	
Población sana mestiza mexicana	D3S1228	0.69	0.71	***	0.04
	D3S3635	0.73	0.78	**	
	D3S1287	0.66	0.66	*	
	SNP	0.40	0.41	NS	

He: Heterocigosidad esperada, Ho; Heterocigosidad observada. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

9. Discusión

La SCA7 es una enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómica dominante, por lo que la probabilidad de transmisión a los descendientes de primer grado es del 50% y el simple hecho de presentar un solo alelo mutado repercute en el desarrollo de dicha patología. Clínicamente es una patología de rápida evolución, es decir, puede llevar a los pacientes a perder sus funciones motoras con un alto grado de discapacidad, llevándolos primero a la necesidad de usar una silla de ruedas y posteriormente llevar irremediabilmente a la muerte del paciente.

A pesar de que a lo largo del mundo existen pocos casos registrados con esta patología, se han reportado casos en donde se tiene una alta prevalencia de SCA7, como es el caso de los países nórdicos principalmente Suecia y Finlandia, Sudáfrica y recientemente se ha reportado un alto número de pacientes en nuestro país, específicamente en el Estado de Veracruz^{30,48}

Los hallazgos de pacientes con SCA7 en México se reduce a 2 reportes; en un estudio inicial en el año 2007 se analizaron diversos pacientes con características clínicas de ataxias espinocerebelosas autosómico dominante en un centro de referencia a nivel nacional, el cual reportó que entre las cinco ataxias más comunes en el territorio mexicano se encontraba la SCA7, pero ocupando el cuarto lugar con un porcentaje de 7.4% en 108 individuos analizados, muy por debajo de SCA2 que se encontró en el primer lugar con cerca del 50% de los casos. Sin embargo en el año 2013, se identificó una alta prevalencia de SCA7 en el Sureste del país, identificando alrededor de 71 casos confirmados con un diagnóstico positivo. Este número supera por mucho, a los individuos identificados con SCA2 reportados por Alonso y colaboradores, en el año 2007. Estas inconsistencias pueden ser explicadas debido a que el primer estudio se realizó en un centro de referencia a nivel central, lo que indicaría que no es representativo de todo nuestro país, por lo que la variabilidad de la presencia de los diversos tipos de SCA podría variar entre las diversas regiones de México. Esto es importante, ya que en un momento dado sería fundamental analizar la frecuencia de los diversos tipos de SCA en diferentes regiones geográficas de México, para tener una mejor visión de la frecuencia de estas enfermedades en nuestro territorio nacional. Por lo que respecta al hallazgo de un gran número de pacientes con SCA7 en la zona central de Veracruz, es importante conocer cuál es el fenómeno que

propició la alta prevalencia en esta región, y los riesgos que pudieran tener los habitantes de esta zona geográfica.

9.1 Efecto fundador

Específicamente, en el presente trabajo se analizaron individuos que presentaron un diagnóstico molecular positivo para SCA7 (grupo de portadores de SCA7), reclutados de cuatro comunidades aledañas en el sureste del estado de Veracruz, las cuales son Xalapa que es la capital del estado de Veracruz, Tuzamapan, Tlaltetela y Cosautlán, estas comunidades abarcan no más de 1,200 km² (Figura 18), siendo Tlaltetela la región donde se presentaron el mayor número de casos de SCA7 (N=37), con una prevalencia de 817 individuos por cada 100,000 habitantes, lo que significa que es la región con mayor prevalencia a nivel mundial.³⁰

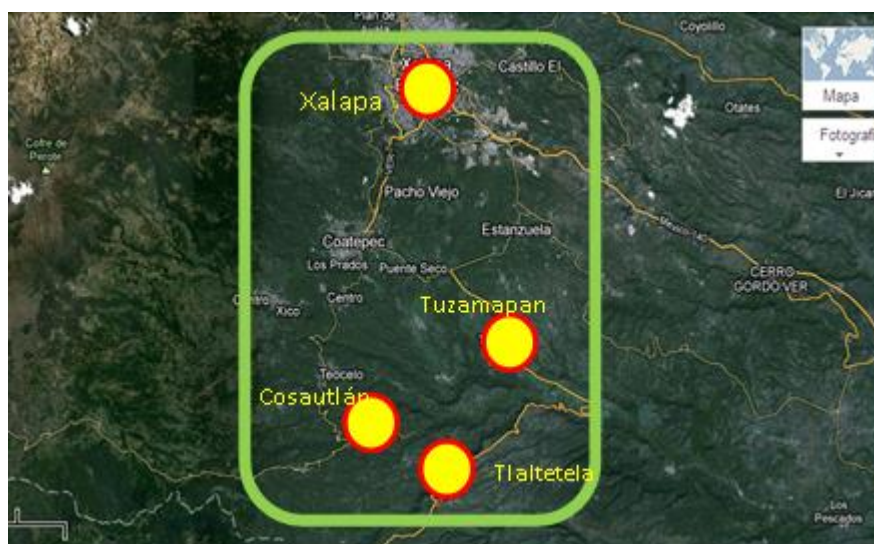


Figura 18. Zona Geográfica de las diferentes comunidades con portadores de SCA7.

La aparición de un alto número de casos de SCA7 en una región tan pequeña nos llevó a plantear la hipótesis del origen de la mutación en esta zona del país. El primer paso fue identificar si todos los pacientes se encontraban de alguna manera relacionados entre sí. Al realizar un estudio genealógico de los 54 individuos que ya presentaban las características clínicas de SCA7 y 17 individuos asintomáticos, se encontró que la mutación de SCA7 estaba presente en un total de ocho familias independientes, por lo que el simple hecho de un efecto de consanguinidad podría descartarse como el único efecto que propició el desarrollo de SCA7, aunque no se descarta que efectos de consanguinidad contribuyeran de manera parcial a la alta frecuencia en esta región. De acuerdo con lo

reportado por Magaña y colaboradores³⁰ las genealogías analizadas muestran un máximo de 7 generaciones con SCA7 (Figura 19), lo que sugiere que el origen de esta patología podría haberse iniciado aproximadamente 140 años atrás, lo cual puede estar relacionado con las fundaciones de estas poblaciones.

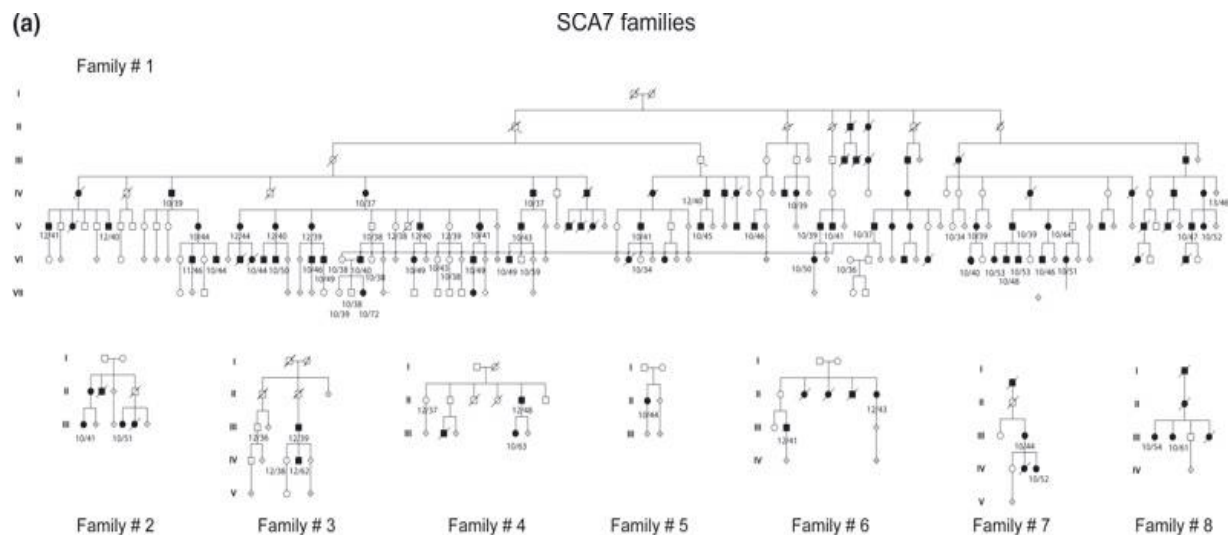


Figura 19. Pedigrees de las familias con SCA7. Se muestran ocho familias correspondientes al estado de Veracruz. La familia 1 es originaria de Tlaltetela y fue la que más miembros tiene y la que se pudo obtener un rastreo de siete generaciones, las familias de la 2 a la 8 no se encontraron relación alguna con la familia 1.³⁰

Históricamente se sabe que antes de 1900 ya existían diversas rancherías posiblemente dirigidas por caciques, donde probablemente algunos pudieron ser Europeos, los trabajadores eran individuos nativos americanos originarios de esta zona y que pronto fueron poblando la región y organizándose en comunidades. Por ejemplo, la comunidad con la mayor frecuencia de portadores de SCA7 reportada a nivel mundial “Tlaltetela” fue fundada en 1919,⁷⁸ poco a poco fue albergando individuos de las rancherías adyacentes, algunos habitantes de la congregación de Limones que pertenece al municipio de Cosautlán, llegaron unos cuantos años después de la fundación de la comunidad, y en la actualidad son poblaciones que coinciden con la presencia de pacientes afectados por la SCA7. Todos estos hechos nos muestran que el inicio de la enfermedad podría tener un origen común, lo que sugeriría un efecto fundador.

9.2 Haplotipo común para portadores de SCA7

Los marcadores tipo microsatélite y el marcador tipo SNP utilizados en este trabajo están segregando junto con la mutación de SCA7, es decir, cuando se presente la expansión anormal de trinucleótido CAG dentro del gen *ATXN7*, un alelo específico de cada marcador va estar en el cromosoma que porte tal mutación, permitiéndonos poder determinar un origen común. Por lo que en todos los portadores de SCA7 se encontró un alelo específico para cada marcador (alelo A –marcador rs3774729; alelo 254- marcador D3S1287; alelo 98- marcador D3S3635; alelo 82- marcador D3S1228), presentando diferencias estadísticamente significativas en comparación con los otros tres grupos de estudio (Tabla 17).

Analizar a la población sana mestiza mexicana da validez externa al estudio realizado, ya que en ella podemos ver la distribución de los alelos y ver un reflejo de la diversidad genética en la población, además podemos observar si los alelos tienen o no un porcentaje similar al que presentan los portadores de SCA7, de esta manera podemos determinar si estos alelos son característicos de la población sana mestiza mexicana o se encuentran asociados a la patología. De manera directa, nuestro grupo de controles comprendió a individuos sanos no relacionados entre sí y no relacionados con individuos que presenten la patología, y que además viven en la región geográfica donde se ha localizado la aparición de esta enfermedad (comunidad de Tlaltetela), por lo que su comparación nos lleva a tener un acercamiento de la distribución de los alelos de los marcadores utilizados en la zona donde se presentan los casos de SCA7. Finalmente, el grupo de los familiares nos da información importante pues aunque son familiares directos, las frecuencias alélicas y genotípicas presentan una distribución diferente, lo que nos indica que realmente el alelo de cada marcador presente en el grupo de portadores de SCA7, es el alelo que se está segregando junto con la mutación y que la región cercana al locus de *ATXN7* está en desequilibrio de ligamiento.

Para comprobarlo, al analizar la conformación del haplotipo para los 4 marcadores utilizados encontramos que el haplotipo A-254-98-82 se presentó en todos los individuos portadores de la mutación para SCA7 (100%) (Figura 17 y 20), mientras que sólo se presentó en un 5% en el grupo control y de manera similar en un 6% en el grupo de población sana mestiza mexicana como en un 7% en el grupo de familiares sanos. Estas diferencias entre el grupo de portadores de SCA7 y los otros grupos hacen suponer que

este haplotipo está ligado a la mutación, sin embargo la presencia de este haplotipo en un muy bajo porcentaje en los otros grupos de estudio se explica debido a que los 4 marcadores analizados no son tan polimórficos en nuestra población, ya que para el marcador D3S1287 encontramos sólo 9 alelos, así como 14 alelos para el marcador D3S1228 y 10 alelos para el marcador D3S3635, mientras que el marcador rs377429 por su naturaleza bi-alélica sólo puede presentarse 2 alelos (alelo A y G). La probabilidad de que este haplotipo aparezca en la población general es de 2.89×10^{-3} , lo que se traduce que 1 de cada 346 individuos concordará con el haplotipo común. Por lo tanto, la presencia del mismo haplotipo ligado a la mutación, puede aparecer en un muy bajo nivel en la población sana, sin la obligación de que se encuentre asociada a la mutación, por lo que estos marcadores nos ayudaron a determinar sí la población en estudio presenta un origen común, pero jamás podrá ser utilizado como un método diagnóstico.

Es relevante mencionar que al determinar el desequilibrio de ligamiento por cada marcador se encontró que los alelos que conforman el haplotipo mencionado presentan un fuerte desequilibrio con la mutación ($p < 0.05$). De acuerdo a todos estos datos podemos inferir que todos los individuos positivos para SCA7, a pesar de estar conformados en diversas familias tienen un origen común, por lo que se puede sugerir fuertemente un efecto fundador para la mutación de SCA7 en el sureste de México.

Además de los factores genéticos estudiados en este trabajo, la clara presencia del efecto fundador puede explicarse también por las condiciones geográficas y culturales de estas poblaciones. Las cuatro comunidades están situadas en regiones montañosas específicamente en las estribaciones de la Sierra Madre Oriental, lo cual hace que sea una zona aislada y de difícil acceso. Esto explicaría la movilidad de individuos portadores de la mutación dentro de esta misma región. Por otro lado los aspectos culturales como matrimonios consanguíneos pudieron haber incrementado la presencia de esta patología.

En la literatura encontramos que SCA7 tiene diferentes orígenes, en donde se observa que para un mismo marcador tenemos alelos diferentes que segregan junto con la mutación dependiendo principalmente de la zona geográfica, aunque en este trabajo se utilizaron los marcadores mencionados en la tabla 5, (rs377429-D3S1287-D3S3635-D3S1228) no podemos comparar los alelos reportados con otras poblaciones al menos para los marcadores microsatélite, pues las técnicas utilizadas en ese entonces no eran tan específicas como lo son ahora.

9.3 Determinación del origen de la expansión parenteral

Por otro lado, el uso de los marcadores moleculares fue importante para discernir en un caso específico el origen parental de la mutación. En este caso particular, se identificó un infante de 11 años de edad con 72 repetidos CAG, siendo este los casos más graves de los pacientes con SCA7 analizados hasta el momento dentro del estado de Veracruz. Al ser una expansión muy grande, era necesario conocer de quién había heredado la patología; al analizar a los padres, se identificó que ambos eran positivos para la mutación (♂ con 40 repetidos CAG; ♀ con 38 repetidos CAG) (Figura 20), por lo que ahora era importante conocer la vía parental de inestabilidad.

Para determinar si el alelo mutado era heredado por la madre o por el padre, se realizó el seguimiento a través del uso de los marcadores genéticos estudiados en este trabajo. Conforme a su haplotipo se determinó que la expansión fue heredada por parte del padre a la hija, donde se hace evidente la presencia del fenómeno de anticipación genética característico de SCA7, aumentando 32 unidades de repetidos, mientras que en el caso de los dos hijos restantes (también positivos para la mutación) el alelo mutado es heredado por parte de la madre, sin embargo la herencia de la madre al hijo no presenta inestabilidad, es decir se conserva el número de repetidos, mientras que en la hija se ve una pequeña inestabilidad de 1 repetido, por lo que podemos concluir que en este caso la mayor inestabilidad presentada fue transmitida por vía paterna, como se reporta en varias enfermedades poliglutamínicas.

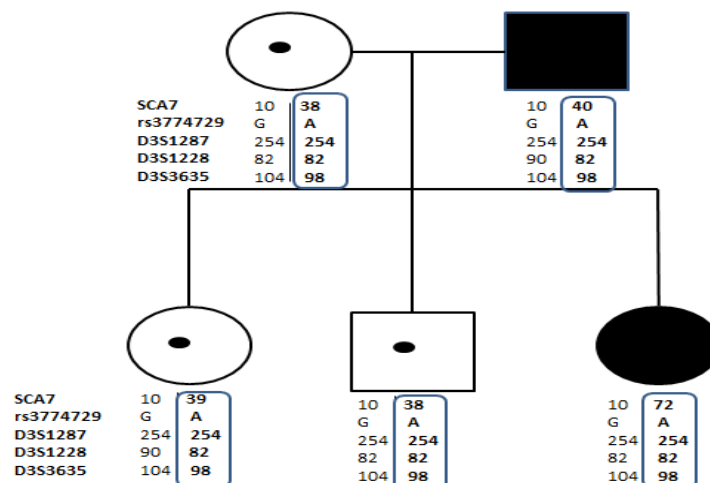


Figura 20. Pedigree de la familia con el individuo de mayor número de repetidos. Los dos padres son portadores de la mutación de SCA7, sin embargo la mamá de 36 años de edad aún no presenta sintomatología en cambio el papá de 37 años ya tiene una historia clínica, la segunda hija tiene 72 repetidos CAG.

9.4 Análisis poblacional

De acuerdo con el principio del equilibrio de Hardy-Weinberg, el grupo control y los familiares sanos están en equilibrio, pues las frecuencias observadas son similares a las esperadas. Sin embargo en el grupo de pacientes vemos que no está en equilibrio pues existe una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias observadas y las esperadas (Tabla 18). El parámetro de F_{IS} para los portadores de SCA7 da un valor de -0.32 representando un gran número de heterocigotos, al observar los genotipos de los marcadores (Figura 15) vemos que en efecto si hay más heterocigotos en el grupo de portadores para los marcadores D3S1228 y D3S3635, este resultado también nos resalta un claro efecto fundador, pues conjuntando los datos históricos y genéticos, se sugiere que la población migrante que llegó a estas regiones se mezcló con los individuos nativos de estas comunidades, y que por lo visto las dos poblaciones eran endogámicas por lo que al mezclarse dio como resultado muchos heterocigotos pues solamente se segregaban los alelos más comunes en ambas poblaciones. Por lo que el incumplimiento de una población con el principio de Hardy-Weinberg, nos refleja que la población pudo haber sufrido un efecto de alguna o algunas fuerzas evolutivas tal como la migración, mutación, expansión o reducción de la población.⁵⁰

Por otra parte el desequilibrio de Hardy-Weinberg que se presenta en la población mestiza mexicana es relevante y puede ser explicado por la estratificación poblacional que presenta México, por lo que la gran mayoría de los marcadores polimórficos se encuentran en desequilibrio con el principio de Hardy-Weinberg.⁷⁹

9.5 Origen de la mutación

Aunque en la literatura ya existan haplotipos reportados para SCA7 en diferentes zonas geográficas, la comparación con el haplotipo encontrado en la población mexicana no es exitosa, pues las técnicas utilizadas varían en la especificidad, no obstante, podemos comprar solamente el polimorfismo rs377429, que el grupo liderado por Stevanin fue el primero en reportarlo, de acuerdo con el reporte, se indica que de todas las familias analizadas solamente aquellas de origen francés presentan el alelo A (de acuerdo a su nomenclatura de Stevanin es alelo B)⁴⁷, que en nuestra población fue el que segregó con la mutación de SCA7, por lo que se sugiere que una posibilidad de la presencia de la mutación en nuestra población pudo haber migrado de Francia a nuestro país, sin embargo, para comprobar esto se necesita determinar la ancestría de los portadores de

SCA7 por medio de haplotipos de marcadores neutros cómo es el caso de marcadores microsatélites presentes en el cromosoma Y, pues sabemos que son uniparentales y que por medio de estos marcadores podemos determinar el haplogrupo ancestral de los portadores de SCA7.

10. Conclusiones

El haplotipo A-254-98-82 fue común para todos los portadores con SCA7 estando presente en un 100% de los individuos con la mutación, a diferencia de los otros grupos estudiados, donde la frecuencia de este haplotipo es muy baja.

El haplotipo A-254-98-82 se encuentra ligado a la presencia de la expansión anormal de repetidos CAG en el gen *ATXN7* en la población analizada.

La presencia de la baja frecuencia del haplotipo A-254-82-98 en la población Mexicana sana se debe a la alta Probabilidad de coincidencia al azar (PIC), debido al bajo poder polimórfico de los marcadores analizados.

Los individuos portadores de SCA7 en la región central del estado de Veracruz tienen un origen común, por lo tanto la mutación fue originada por un “efecto fundador”.

El uso de los marcadores polimórficos ligados a la mutación de SCA7 son útiles para determinar la transmisión parental en los casos donde los dos padres sean portadores de la expansión anormal.

El alelo A del polimorfismo rs377429 es frecuente en las familias de origen francés lo que podría sugerir que la mutación fundadora que encontramos en México posiblemente llegó debido a una migración.

11. Perspectivas

Determinar la ancestría de los portadores con SCA7, mediante un análisis con marcadores uniparentales como aquellos microsatélites localizados en el cromosoma Y.

Seguir identificando individuos asintomáticos, para ayudar en la toma oportuna de decisiones médicas sobre su tratamiento, el asesoramiento genético y la ayuda psicológica.

Mejorar el plan de rehabilitación en cada una de las comunidades afectadas.

12. Referencias

1. Klockgether T, Paulson H. Milestones in Ataxia. *Movement Disorders* 2011, vol. 26 (6):1134-1141
2. Orr H.T. Cell biology of spinocerebellar ataxia. *J. Cell Biol.* 2012, 197 (2): 167-177.
3. Matilla-Dueñas A, Corral-Juan Marc, Volpini V, Sanchez I. The Spinocerebellar Ataxias: Clinical Aspects and Molecular Genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, 724:351-74
4. Anheim M, Tranchant C, Koenig M. The Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias. *N Engl J. Med* 2012; 366: 636-46.
5. Finsterer J. Ataxias with Autosomal, X-Chromosomal or Maternal Inheritance. *Can. J. Neurol. Sci.* 2009, 36: 409-428.
6. Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M, Tallaksen CM. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain* 2009, 132: 1577-1588
7. Sailer A, Houlden H. Recent Advances in the Genetics of Cerebellar Ataxias. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2012, 12:227-236
8. Magaña JJ, Velázquez-Pérez L, Cisneros B. Spinocerebellar ataxia type 2: clinical presentation, molecular mechanisms, and therapeutic perspectives. *Mol Neurobiol.* 2013 Feb;47(1):90-104.
9. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1984, 21; 1(8334):1151-1155
10. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Liu W, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spino-cerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am. J. Hum. Genet.* 2011, 89:121-130.
11. Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, Maat-Kievit A, Leegwater P, Dooijes D, Oostra BA, Heutink P. A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 191-99
12. Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, Lashley T, Hernandez D, Worth P, Singleton AB, Hilton DA, Holton J, Revesz T, Davis MB, Giunti P, Wood NW. Mutation in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet* 2007; 39:1434-1436M

13. Ford E.B. Genetic Polymorphism. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1966, 166:350-361
14. Oliveira E.J., Gomes Pádua J., Zucchi M.I. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 2006, (2):294-307.
15. Mirkin S.M. Expandable DNA repeats and human disease. 2007, 447:932-940
16. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma Focus* 2000, 109:365-371.
17. Wells RD, Dere Ruhee, Hebert ML, Napierala M, Son LS. Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acids Research* 2005, 33(12):3785-3798.
18. McMurray CT, Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nature* 2010, 11:786-799
19. Seznec H, Simon D, Bouton C, Reutenauer L, Hertzog A, Golik P, Procaccio V, Patel M, Drapier JC, Koenig M, Puccio H. Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet* 2005, 14: 463–474.
20. Matilla-Dueñas A, Corral-Juan Marc, Volpini V, Sanchez I. The Spinocerebellar Ataxias: Clinical Aspects and Molecular Genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, 724:351-74
21. Tanaka M, Morishima I, Akagi T, Hashikawa T, Nukina N. Intra- and intermolecular beta-pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 45470–45475.
22. Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat. Genet.* 1998), 18: 150–154.
23. Yamada M, Tsuji S, Takahashi H. Pathology of CAG repeat diseases. *Neuropathology* 2000, 20: 319–325.
24. Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998, 95:55– 66.
25. Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 2004, 3; 291:304
26. La Spada AR, Fu YH, Sopher BL, Libby RT, Wang X, Li LY, Einum DD, Huang J, Possin DE, Smith AC, Martinez RA, Koszidin KL, Treuting PM, Ware CB, Hurley JB,

- Ptácek LJ, Chen S. Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron* 2001;31:913-27
27. Jayadev S, Bird TD. Hereditary Ataxia Overview. *Genet Med*. 2013 Mar 28.
28. Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, Mader C, Ochoa A, Yescas P, Gutiérrez R, White M, Ruano L, Fragoso-Benítez M, Ashizawa T, Bidichandani SI, Rasmussen A. Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord*. 2007 May 15;22(7):1050-3.
29. Tapia Guerrero Yessica S. Diagnóstico molecular de las ataxias espinocerebelosas tipo -1,-2,-3,-6 y -7 a través de electroforesis capilar en la población mestizo-mexicana. Tesis de maestría, IPN, 2012.
30. Magaña J, Tapia-Guerrero Y, Velázquez-Pérez L, Cerecedo-Zapata C, Maldonado-Rodríguez M, Jano-Ito J, Leyva-García N, González-Piña R, Martínez-Cruz E, Hernández-Hernández O, Cisneros B, Tapia-Guerrero Y, Velázquez-Pérez L, Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: Epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clin Genet*. 2013
31. van de Warrenburg BP, Frenken CW, Ausems MG, Kleefstra T, Sinke RJ, Knoers NV, Kremer HP. Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. *J Neurol* 2001; 248: 911- 914
32. Helmlinger D, Hardy S, Eberlin A, Devys D, Tora L, Hardy S. Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Biochem Soc Symp*. 2006;(73):155-63
33. Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, et al. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 1994, 263 (5148), 808-811.
34. Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, et al. Crx, a novel Otxlike paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 1997,19:1017-1030
35. Nakamura Y, Tagawa K, Oka T, Sasabe T, Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. *Hum Mol Genet*. 2012 Mar 1;21(5):1099-110.
36. Garden GA, Libby RT, Fu YH, Kinoshita Y, Huang J, Possin DE, Smith AC, Martinez RA, Fine GC, Grote SK, Ware CB, Einum DD, Morrison RS, Ptacek LJ, Sopher BL, La Spada AR Polyglutamine-expanded ataxin-7 promotes non-cell-autonomous Purkinje cell degeneration and displays proteolytic cleavage in ataxic transgenic mice. *J Neurosci* 2002, 22:4897–4905.

37. Abou-Sleymane G, Chalmel F, Helmlinger D, et al. Polyglutamine expansion causes neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program. *Human Mol. Gene* 2006, 15 (5): 691-703.14
38. La Spada AR, Fu YH, Sopher et al. Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron* 2001;31:913-27
39. McCullough SD, Grant PA. Histone acetylation, acetyltransferases, and ataxia--alteration of histone acetylation and chromatin dynamics is implicated in the pathogenesis of polyglutamine-expansion disorders. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2010;79:165-203.
40. Young JE, Gouw L, Propp S, et al. Proteolytic cleavage of ataxin-7 by caspase7 modulates cellular toxicity and transcriptional dysregulation. *J Biol Chem.* 2007 Oct 12;282(41):30150-60
41. Chen S, Peng GH, Wang X, Smith AC, Grote SK, Sopher BL, et al. Interference of Crx-dependent transcription by ataxin-7 involves interaction between the glutamine regions and requires the ataxin-7 carboxy-terminal region for nuclear localization. *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13, 53–67.
42. Hennig AK, Peng GH, Chen S. Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network. *Brain Res.* 1192, 114–133
43. Palhan VB, Chen S, Peng GH, Tjernberg A, Gamper A M, Fan, Y, et al., (2005). Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 102: 8472–8477.
44. Velázquez Pérez L, Cruz GS, Santos Falcón N, et al. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: insights into SCA2 founder effect in Holguín. *Neurosci Lett* 2009; 454: 157-60
45. Mori M, Adachi Y, Kusumi M, Nakashima K. Spinocerebellar Ataxia type 6: founder effect in Western Japan. *J Neurol Sci.* 2001 185: 43-47.
46. Jayadev S, Michelson S, Lipe H, Bird T. Cambodian founder effect for spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *J Neurol Sci.* 2006 250: 110-113.
47. Stevanin G, David G, Dürr A. et al. Multiple origins of the spinocerebellar ataxia 7 (SCA7) mutation revealed by linkage disequilibrium studies with closely flanking markers, including an intragenic polymorphism (G3145TG/A3145TG). *Eur J Hum Genet.* 1999 Dec;7(8):889-96.

48. Jonasson J, Juvonen V, Sistonen P, et al. Evidence for a common spinocerebellar ataxia. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 918-22.
49. Greenberg J, Solomon G, Vorster A, et al. Origin of the SCA7 gene mutation in South Africa: implications for molecular diagnostics. *Clin Genet* 2006; 70: 415–417
50. Hedrick P. *Genetics of Populations*. Fourth Edition 2010. Jones and Bartlett Publishers
51. Diamond JM, Rotter JI. Observing the founder effect in human evolution. *Nature* 1987, 329:105-106
52. Schlötterer C. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion?. *Nat Rev Genet*. 2004 Jan;5(1):63-9.
53. Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael J.M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 1999, 87: 551-568
54. Kerem, B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-1080 (1989)
55. Böhne A, Brunet F, et al. Transposable elements as driver of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research* 2008, 16:203-215
56. Chénais B, Carusco A, Hiard S, et al. The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: From genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene* 2012, 509:7-15
57. Batzer Mark A, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature* 2002, 3:370-379
58. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006, 7: 85–97.
59. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, et al. Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Res* 2006, 16: 949–961
60. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet*. 2004, 36: 949–951.
61. Vergnaud G, Denoeud F. Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Res* 2000, 10: 899-907.
62. Lander ES, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409: 860-921.
63. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD. Re-peat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet*. 2005 Oct;6(10):729-42

64. You-Chun Li, Abrah Korol, Tzion Fahima, Eviatar Nevo. Mi-crosatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 21(6):991–1007. 2004
65. Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with
66. Brookes A. The essence of SNP. *Gene* 1999, 234:177-186.
67. Wang DG, Fan J, Siao Berno A, et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 1998, 280:1077-1082.
68. Jurgen Del-Favero, Luc Krols, Andrej Michalik. Molecular genetic analysis of autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCA type II) caused by CAG triplet repeat expansion. *Human Molecular Genetics*, 1998, Vol. 7, No. 2
69. Krols L, Martin JJ, Gilles D. Refinement of the locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type II to chromosome 3p21.1-14.1. *Human Genet* 1997, 99:225-232
70. Benomar A, Krols, Stevanin G. et al. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1. *Nature Genetics* 1995, 10:84-88
71. Lowe A, Harris S, Ashton P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing. C. 1. P. p. 326
72. Avise, J.C. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, NY1994.
73. Hartl DL, AG Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. Massachusetts. USA.
74. Hey, J y C. A. Machado. 2003. The study of structure populations-New hope for a difficult and divided science. *Genetics*: 4, 535-543.
75. Bruce Alberts, Dennis Bray, et al. *Molecular Biology of the Cell*, 3th edition. New York: Garland Science; 2002
76. Magaña JJ, de la Luz Arenas-Sordo M, Gómez Ortega R. Capillary electrophoresis, a new diagnostic tool. *Rev Med Chil.* 2009 Jul;137(7):946-56
77. Frackman S, Kobs G, Simposon D, Storts D. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes Number 65*.1998. p.27
78. <http://www.tlaltetela.gob.mx/historia/>
79. Noris G, Santana C, Meraz-Ríos MA, de Lourdes Munoz M, Majluf-Cruz A, Magaña JJ, Granados J, Quezada R, Revilla MC, Martínez-Salas S, Xihuitl S, Martínez de la

Escalera G, Díaz-Badillo A, Calderon-Aranda ES, Gómez R. Mexican mestizo population sub-structure: effects on genetic and forensic statistical parameters. *Mol Biol Rep.* 2012 Dec;39(12):10139-56.