



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

“IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
DE LA ATAXIA DE FRIEDREICH”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

BARONA CRUZ CARLOS

DIRECTOR: DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

ASESOR: MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA

México, D. F. a 14 de Octubre de 2013





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIAS

*A mis abuelas:*

*María de la Luz, cuyo recuerdo se encuentra en mi mente y mi corazón.*

*Sabina, a quién Dios le ha permitido observar mi desarrollo día a día y que hoy es testigo de la culminación de mi formación profesional.*

*A mis abuelos:*

*Tobías y Andrés, a quienes no tuve oportunidad de conocer en persona, pero que sé que desde donde están, cuidan de mí y me ha apoyado en cada paso que doy.*

*A mis padres, Bertha y Javier, ya que sin su apoyo, confianza y amor, no hubiera logrado llegar hasta donde estoy ahora.*

*Gracias  
Carlos*

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de CONACYT No. 69210 , por brindar los apoyos necesarios para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez y al departamento de Neurogenética de éste instituto, por abrirme las puertas y brindarme el apoyo necesario para el desarrollo de este trabajo.

A mis asesoras y profesoras en el Instituto: Dra. Ma. Elísa Alonso Vilatela, Dra. Petra Yescas Gómez y M. en C. Nancy Monroy Jaramillo, cuyo tiempo, apoyo, consejos, confianza y enseñanzas brindados desde el 1er. día que estuve en el laboratorio me han ayudado en mi formación profesional y en mi crecimiento personal.

A los compañeros (que poco a poco se convirtieron en mis amigos) que estuvieron conmigo durante mi estancia en el Instituto: Edgar, Lizabeth, Ik-Taníl, Andrea, Alberto, Francisco, Sirley, Isabel, David e Ingrid, con los que cada día era grato y a quienes les agradezco momentos inolvidables, risas, consejos, enseñanzas y pláticas interminables, las cuales espero sigan por mucho tiempo.

A mi hermana, Aníta, quien vio mis primeros pasos, compartió juegos, sonrisas, abrazos, alegrías, tristezas, logros y desventuras a lo largo de estos 26 años y a quien agradezco su tiempo, cariño y confianza, así como el apoyo brindado a lo largo de mi vida, y a mi hermano, Javier, por las enseñanzas brindadas a lo largo de mi vida y por su cariño brindado.

A mi madre, Bertha, la cual me tuvo con la esperanza de ser una persona de bien y cuyos sueños e ilusiones me han llevado hasta donde estoy, aunque no todos se han cumplido, sé que este pequeño paso es el primero de muchos más, y espero que Dios le de salud y fortaleza para que le permita verlos.

A mi padre, Javier, que me dio la vida y cuyos consejos y enseñanzas han dado frutos poco a poco. Gracias por el apoyo brindado, el cariño y la confianza que pusiste en mí desde el inicio, esperando que Dios te de salud y fortaleza para que me acompañe a cosechar todos los logros que se vayan dando.

A mis tíos, Olivia y Gerardo, cuyo apoyo y cariño ha sido muy valiosos para mí, desde que tengo uso de razón. Gracias por todos los consejos brindados.

A mi tía, Rosy, quien ha sido como una madre más, gracias por estar a mi lado y por el cariño, consejos y apoyo brindado a lo largo de mi vida.

A mis padrinos, Ma. De Jesús y Julián, y a mis tíos, Cesar y Laura, quienes han estado atentos de mi desarrollo y a quienes agradezco su apoyo y cariño a lo largo del camino.

A mis primas: Alma, Araceli, Alejandra y Alicia, quienes me han motivado y han sido mi inspiración para seguir adelante y terminar mi formación profesional.

A mis primos: Luis, Alan y Edgar, con quienes he compartido experiencias, risas, chistes y conocimientos.

A mis compañeras de vida y amigas durante la carrera: Adriana, Leslie, Alida y Casandra, con quienes compartí infinidad de risas, buenos momentos, diversión, noches de estudio, confidencias y sobre todo, experiencias de vida. Gracias por el apoyo brindado y por la compañía, tanto que puedo decir que son como mis hermanas.

A esa persona importante que me ha hecho ver la vida con otros ojos, con otra perspectiva, y que me ha dado infinidad de lecciones, las cuales recordaré siempre y mantendré vivas, esperando ser mejor persona día a día y que siempre estaré agradecido por ello... Siempre estas presente, gracias RVR.

## ABREVIATURAS

**AD:** Herencia autosómica Dominante

**AR:** Herencia Autosómica Recesiva

**BLGR:** Buffer (Solución amortiguadora) de Lisis de Glóbulos Rojos

**cbp:** Expresión utilizada para realizar disoluciones, que significa “cuanto baste para”

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico, de sus siglas en inglés *Desoxyribonucleic Acid*.

**EC:** Electroforesis Capilar

**ECG:** Electrocardiograma

**EDTA:** Ácido Etilendiamino tertrasódico

**EMG:** Electromiografía

**FARR:** Ataxia de Friedreich con Reflejos Conservados, de sus siglas en inglés *Friedreich's Ataxia with Retained Reflexes*

**FRDA:** Ataxia de Friedreich, de sus siglas en inglés *Friedreich's Ataxia*.

**FXN:** Proteína Frataxina, codificada por el gen *FXN (FRDA)*.

**GLRX 5:** Glutaredoxina 5, participante en el probable funcionamiento de la proteína Frataxina.

**INNEMVS:** Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

**IRM:** Imágenes de Resonancia Magnética

**ISC:** Conjuntos (o agrupamientos) de Hierro y Azufre, de sus siglas en inglés: *Iron-Sulfur Cluster*.

**LOD SCORE:** Medida matemática de la probabilidad relativa que tienen dos loci de estar ligados. Se calcula como el logaritmo de una razón, así que valores más altos indican un ligamiento más fuerte. En genética humana, para que este cociente sea significativo al 95% se requiere que sea **mayor** a 3.

**M:** Molaridad, Molar (mol/Litro)

**MFRN:** Mitoferrina

**min:** Minutos

**mL:** Mililitros

**mM:** Milimolar (mmol/mL)

**MPM:** Marcador de Peso Molecular, expresado en pares de bases (pb)

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**N:** Normalidad (equivalentes/Litro)

**nm:** Nanómetros

**pb:** Pares de Bases

**PBS:** Amortiguador de Fosfatos en solución salina, de sus siglas en inglés

*Phosphate Buffer Saline*

**PCR XL:** Reacción en Cadena de la Polimerasa para fragmentos largos

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PDB:** Base de Datos de Proteínas, de sus siglas en inglés: *Protein Data Base*

**rpm:** Revoluciones por minuto

**SCA:** Ataxia Espinocerebelosa, de sus siglas en inglés *Spinocerebellar Ataxia*

**SCA's:** Ataxias Espinocerebelosas

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio

**seg:** Segundos

**T4-PNK:** Enzima T4-Polinucleótido Quinasa, de sus siglas en inglés *T4-Polynucleotide Kinase*.

**TAC:** Tomografía Axial Computarizada

**TBE:** Amortiguador de corrimiento para electroforesis Tris-EDTA-Ácido Bórico

**Tm:** Temperatura media óptima de alineación de los cebadores en una PCR.

**TP-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa con Triple Cebador

**UV:** Longitud de onda en el espectro Ultravioleta correspondiente al intervalo desde 10nm a 400nm.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 Clínica .....	15
2.2 Patología .....	18
2.3 Genética.....	19
2.3.1 Localización Cromosómica .....	19
2.3.2 Genética Molecular .....	19
2.4 Función de la Proteína .....	22
2.5 Tratamiento .....	25
2.6 Diagnóstico molecular .....	25
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Objetivo general .....	33
4.2 Objetivos particulares .....	33
<b>5. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>34</b>
<b>6. POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	<b>34</b>
<b>7. CRITERIOS</b> .....	<b>35</b>
7.1 Inclusión .....	35
7.2 Exclusión.....	35
7.3 Eliminación.....	35
7.4 Variables .....	35
<b>8. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>36</b>
<b>9. DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	<b>37</b>
9.1 Material .....	37
9.2 Instrumentos.....	38
9.3 Equipo.....	38
9.4 Reactivos y Soluciones .....	39
9.5 Metodología.....	42

9.5.1 Aislamiento de DNA.....	42
9.5.1.2 Lisis y almacenamiento de Glóbulos Blancos (Buffy Coat).....	43
9.5.1.3 Cuantificación y calidad del DNA .....	44
9.5.2 Tamizaje por Análisis de Fragmentos e Implementación de PCR para Fragmentos Largos.....	44
9.5.3 PCR para fragmentos largos empleada para el análisis por Southern Blot .....	46
9.5.4 Electroforesis de Fragmentos Largos .....	49
9.5.5 Transferencia tipo Southern Blot.....	50
9.5.6 Pre-Hibridación de Membranas .....	55
9.5.7 Marcaje del Marcador de Pesos Moleculares por técnica <i>Random Primer</i> ..	56
9.5.8 Marcaje del extremo 5' de la sonda GAA con enzima T4-PNK .....	57
9.5.9 Hibridación.....	60
9.5.10 Autorradiografía .....	61
<b>10. RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>11. DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>12. CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>13. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>14. REFERENCIAS .....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> Clasificación de Enfermedades por Expansión de Tripletes Repetidos ..	14
<b>CUADRO 2.</b> Principales Características de las SCA's.....	16
<b>CUADRO 3.</b> Se muestran las cantidades utilizadas de cada componente incluido en el kit comercial Tru Allele® de Applied Biosystems.....	45
<b>CUADRO 4.</b> Se muestran las cantidades utilizadas de cada componente incluido en el kit comercial de Fermentas® .....	47
<b>CUADRO 5.</b> Se muestran las cantidades utilizadas de cada componente incluido en el kit comercial de la marca KAPA® .....	48
<b>CUADRO 6.</b> Resultados obtenidos mediante el Análisis de Fragmentos de DNA en el secuenciador modelo AB3031 de Applied Biosystems® .....	63
<b>CUADRO 7.</b> Comparación de resultados obtenidos por el Análisis de Fragmentos de DNA en el secuenciador modelo AB3031 de Applied Biosystems® y los obtenidos por la técnica de Southern Blot .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Cromosoma 9. Se muestra el locus donde se localiza el gen <i>FXN</i> , cuya alteración en el triplete GAA da como resultado la FRDA. ....	19
<b>FIGURA 2.</b> Estructura 3D Monomérica de la proteína Frataxina.....	20
<b>FIGURA 3.</b> Modelos de estructuras del DNA triplex intramolecular del DNA pegajoso (sticky). .....	21
<b>FIGURA 4.</b> Funciones de la Frataxina .....	24
<b>FIGURA 5.</b> Procedimiento de la técnica de <i>Southern Blot</i> .....	30
<b>FIGURA 6.</b> Programa para amplificar un fragmento del intrón 1 del gen <i>FXN</i> , tomado del inserto del kit comercial de Fermentas® utilizado en el análisis de fragmentos ...	45
<b>FIGURA 7.</b> Programa para amplificar un fragmento del intrón 1 del gen <i>FXN</i> , tomado del inserto del kit comercial de Fermentas® .....	47
<b>FIGURA 8.</b> Programa utilizado para la amplificación del intrón 1 del gen <i>FXN</i> , de acuerdo al kit comercial de la marca KAPA®.....	48
<b>FIGURA 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% .....	49
<b>FIGURA 10.</b> Equipo iBlot® de Invitrogen, para realizar la transferencia de DNA en seco.....	51
<b>FIGURA 11.</b> Principio del equipo iBlot® para la transferencia en seco de DNA.....	52
<b>FIGURA 12.</b> Sistema de transferencia con solución amortiguadora 10X SSC .....	55
<b>FIGURA 13.</b> Técnicas de marcaje empleada en el Marcador de Peso Molecular, Random Primer (Figura 12A) y para el extremo 5' de la sonda utilizada, con enzima T4-PNK (Figura 12B) .....	59
<b>FIGURA 14.</b> Electroferogramas obtenidos en el Análisis de Fragmentos y analizados mediante el software GeneMapper® 4.0.....	63
<b>FIGURA 15.</b> Fragmento donde se localiza la secuencia del intrón 1 del gen <i>FXN</i> .....	65
<b>FIGURA 16.</b> Autorradiografía obtenida por la transferencia tipo <i>Southern Blot</i> , para el análisis del gen <i>FXN</i> . ....	66

## 1. INTRODUCCIÓN

La Ataxia de Friedreich (FRDA), es la ataxia hereditaria más frecuente, con una prevalencia estimada de 1 en 50,000 y una frecuencia de portadores de 1 en 120 en la población caucásica<sup>1</sup>.

La FRDA es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por un deterioro progresivo del cerebelo y de los ganglios espinales dorsales. Esta degeneración provoca una pérdida progresiva de muchas de las funciones necesarias para una autonomía personal debido a: ataxia progresiva, pérdida de sensibilidad, escoliosis, disfagia, disartria, y en muchos casos está asociada a una miocardiopatía grave, defectos esqueléticos y diabetes mellitus o intolerancia a la glucosa, padecimientos causantes de la muerte en la mayoría de los casos. La enfermedad presenta un modo de herencia autosómico recesivo, así como el inicio de los síntomas generalmente ocurre alrededor de la pubertad, hacia los 10 años y comúnmente antes de los 25 años de edad, lo que conlleva a que los promedios de esperanza de vida varíen entre los 40 y 50 años.<sup>2</sup> El gen asociado con la enfermedad se ha localizado en el cromosoma 9q13-q21.1 y codifica para una pequeña proteína mitocondrial llamada frataxina, la cual no es funcional en esta enfermedad debido a ciertas mutaciones, de las cuales la más común es la expansión anormal de un triplete repetido GAA dentro del primer intrón del gen mencionado anteriormente. En individuos sanos, el rango de repeticiones es de 7 a 28 repeticiones, mientras que en los pacientes con FRDA, el número de repeticiones varía de 66 a 1700.<sup>2</sup>

Aproximadamente el 75% de los pacientes indoeuropeos con ataxia recesiva son homocigotos para mutaciones en el gen de Frataxina (*FXN*) por lo que presentan FRDA típica (hereditaria) o atípica (esporádica). En un estudio previo realizado por un grupo de trabajo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez (INNNMVS), en donde se realizó un análisis previo de 134 mestizos mexicanos con ataxia recesiva, se demostró que FRDA se

presenta en el 10.4%, de la población mexicana comparada con el resto de las ataxias.<sup>3</sup>

La ataxia de Friedreich, presenta un inicio temprano y su rápida progresión depende del número de repetidos GAA. En México, es una de las principales ataxias recesivas y la continua presencia de casos hace necesario implementar su diagnóstico, el cual se realiza por medio de la técnica Southern Blot, con lo cual se determinará el número aproximado de repeticiones del trinucleótido. Esta enfermedad puede llevar a una muerte temprana, por lo que es importante su diagnóstico oportuno para que los portadores de la misma consideren sus riesgos y el de su descendencia, así como las medidas que pueden proporcionar los tratamientos paliativos para mejorar algunos síntomas de la enfermedad, y por lo tanto, la calidad de vida del paciente. Los médicos diagnostican la FRDA realizando un examen clínico minucioso, que comprende una historia clínica y un examen físico-neurológico detallado. Sin embargo, el inicio es insidioso y la falta o desconocimiento de antecedentes familiares requiere del diagnóstico molecular para confirmar la evidencia clínica y descartar otros tipos de ataxia.<sup>17</sup>

## 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La palabra “*ataxia*” proviene del griego y significa “sin orden” del movimiento. En forma estricta, ataxia implica la pérdida de la coordinación, especialmente de la marcha y del movimiento. El diagnóstico de ataxia involucra daño en el cerebelo y la pérdida del equilibrio y la coordinación, incluyendo alteraciones en el inicio del movimiento, la aceleración, la regulación de la velocidad y en la terminación del mismo.<sup>4</sup>

Aunque las causas de las ataxias son múltiples, se pueden clasificar en adquiridas y hereditarias. A su vez, las ataxias hereditarias pueden subdividirse de acuerdo a su modo de herencia en: autosómicas dominantes (AD), autosómicas recesivas (AR), ligadas al cromosoma X y mitocondriales, de las cuales la mayoría de las ataxias AR se presentan antes de los 20 años de edad. Las ataxias AR se asocian con neuropatía periférica sensoriomotora, pérdida de la propiocepción y vibración, disminución o ausencia de los reflejos y compromiso de otros órganos fuera del sistema nervioso central.<sup>5</sup>

Las ataxias heredadas por un patrón autosómico dominante, también denominadas ataxias espinocerebelosas (SCA), son entidades que se caracterizan por una degeneración progresiva del cerebelo, a menudo con cambios en el tronco cerebral y compromiso de otras áreas del sistema nervioso central. Su incidencia varía de 1 a 23 en 100 000 individuos. Debido a su alta complejidad clínica y diagnóstica, las SCA's se han dividido en tres grupos: Las SCA's causadas por repeticiones en la secuencia CAG, la cual codifica para el aminoácido glutamina (también denominadas como enfermedades por poliglutaminas); el segundo grupo de SCA's se origina por repeticiones que se encuentran fuera de la región codificadora del gen o intrónicas, en otras palabras, la repetición de las secuencias no causa síntesis o acumulación de ninguna proteína, como es el caso de la FRDA, la cual presenta una expansión anormal del repetido GAA en el intrón 1 del gen *FXN*; el tercer grupo de SCA's está constituido por enfermedades causadas por mutaciones específicas en genes determinados y no por acumulación de secuencias repetidas (cuadro 1).<sup>2</sup>

**CUADRO 1.** Clasificación de enfermedades por expansiones de tripletes repetidos<sup>2</sup>**TIPO 1**

SCA 1, 2, 3, 6, 7, 17	
DRPLA (atrofia dentato-rubro-palidoluisiana)	
Enfermedad de Huntington	
Enfermedad de Kennedy	
Distrofia Oculofaríngea	Codifica-GCG

**TIPO 2**

No codificante intrónica GAA	FRDA
No codificante-CTG	SCA 8
No codificante-CTG	DMT 1
No codificante-CCTG	DMT 2
	CCG-X frágil
Dodecámero	EPM 3

**TIPO 3**

SCA 5, 13, 14, 27
-------------------

De acuerdo con la ubicación de la expansión del trinucleótido dentro de la estructura génica, aquellos individuos en los que la mutación se localiza en secuencias génicas no codificadoras o intrones como es el caso de la FRDA forma parte de un nuevo mecanismo productor de enfermedades humanas, que son altamente inestables tanto en meiosis como en mitosis, lo que las convierte en un proceso de mutación dinámica que se transmite con un inusual patrón de herencia. Las enfermedades producidas por mutaciones en regiones no codificantes son trastornos multisistémicos que involucran la disfunción o degeneración de diferentes tejidos<sup>6</sup>. En estas patologías, el tamaño y la variación de las expansiones repetitivas es mucho mayor que las ubicadas en regiones codificadoras, como se muestra en el cuadro 2.



## **2.1 Clínica**

El signo más destacable de la FRDA es la ataxia progresiva, que afecta inicialmente la marcha, la postura y también los movimientos de los brazos. Las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad son: arreflexia, debilidad muscular, respuesta plantar extensora (signo de Babinski en el 80% de los casos) y signos de disfunción de la región dorsal. Todos los pacientes con FRDA presentan un trastorno atáxico del habla (disartria), normalmente en los primeros 5 años tras el comienzo de la enfermedad. Debido a la afectación piramidal y a la atrofia muscular, los pacientes con FRDA pueden presentar debilidad considerable en los miembros inferiores y, posteriormente, en los miembros superiores. Aproximadamente, la mitad de estos pacientes presenta deformidades óseas (escoliosis y pies cavos) debido al inicio precoz de la atrofia muscular<sup>4</sup>.

La mayoría de los pacientes presentan también miocardiopatía hipertrófica, así como el 10% de las personas afectadas muestran diabetes.

CUADRO 2. Principales características de las SCA's<sup>5</sup>

Enfermedad	Bianco principal	Principales características clínicas	Rango de edad de aparición	Patrón de herencia	Gen y producto	Localización del repetido	Repetido (Presencia de interrupciones)	Intervalo de tamaño de alelo normal	Intervalo de tamaño de alelos intermedios	Intervalo de tamaño de alelos mutados
SCA 1	Cerebelo, Tallo cerebral	Ataxia Cerebelar Autosómica Dominante Ataxia Cerebelar con otras anomalías neurológicas, arreflexia, sacudidas débiles	5-70	Autosómica dominante con anticipación	SCA 1, ataxina 1	6p22-p23 (exónica)	CAG (CAT)	6-44	---*	40-82
SCA 2	Cerebelo, Tallo cerebral	Cerebelo, Tallo cerebral	9-44	Autosómica dominante con anticipación	SCA 2, ataxina 2	12q24.1 (exónica)	CAG (CAA)	14-31	34-35	34-59
MJD (Enfermedad de Machado-Joseph) / SCA 3	Cerebelo, Tallo cerebral	Cerebelo con otras anomalías neurológicas, rigidez, ojos abultados	17-72	Autosómica dominante con anticipación	SCA 3, ataxina 3	14q32.1 (exónica)	CAG (ninguna)	12-40	---	55-200
SCA 6	Cerebelo	Ataxia Cerebelar pura con discinesia y reflejos anormales Ataxia Cerebelar Autosómica Dominante con degeneración macular	28-50	Autosómica dominante con anticipación (no confirmado)	CACNA1 $\alpha 1_A$ -canal de $Ca^{2+}$	19p13 (exónica)	CAG (ninguna)	4-20	---	21-33
SCA 7	Cerebelo, Tallo cerebral, retina	Cerebelo, Tallo cerebral, retina	28-50	Autosómica dominante con anticipación	SCA 7, ataxina 7	3p21.1-p22 (exónica)	CAG (ninguna)	4-19	28-35	37->300
SCA 8	Cerebelo	Ataxia Cerebelar pura	28-50	Autosómica dominante	SCA 8	19p13 (región 3' no traducida)	CTG (complejo)	16-34	---	100-250**

Enfermedad	Blanco principal	Principales características clínicas	Rango de edad de aparición	Patrón de herencia	Gen y producto	Localización del repetido	Repetido (secuencia oculta)	Intervalo normal del tamaño del alelo	Intervalo intermedio del tamaño del alelo	Intervalo mutante del tamaño del alelo
SCA 10	Cerebelo, corteza cerebral	Ataxia, crisis convulsivas	12-45	Autosómica dominante con anticipación	SCA 10, E46	22q13.3 (intrónica)	ATTCT (ninguna)	10-22	---	>1000
SCA 12	Cerebelo, corteza cerebral	Ataxia, tremor parte superior del cuerpo, hiperreflexia, movimientos pausados, demencia	8-55	Autosómica dominante	PPP2R2B, PP2AB $\beta$	5p31-p33 (5'UTR- región 5' No Traducida)	CAG (ninguna)	7-28	---	66-78
DRPLA (Atrofia dentato-rubro-palidolusiana)	Sistemas dentatorubral, y palidolusiano	Mioclónica progresiva, convulsiones, ataxia y demencia	10-70	Autosómica dominante con anticipación	DRPLA, atrofina 1	12p12 (exónica)	CAG (ninguna)	3-36	---	49-88
FRDA (Ataxia de Friedreich)	Ganglios de la raíz dorsal, médula espinal, cerebelo, nervio periférico	Ataxia progresiva con pérdida de la sensibilidad propioceptiva, arreflexia, cardiomiopatía, diabetes	<20 3-70	Autosómica recesiva	FRDA, frataxina	9q13 (intrón 1)	GAA (ninguna)	7-28	---	120->1700

\* Alelos normales: 40-44 repetidos con interrupciones de 1 ó 2 (CAT)n; alelos considerados patológicos: 40-44 repetidos sin interrupciones. Los puntos indican que los alelos intermedios no han sido reportados en esta enfermedad. \*\* Alelos patológicos de penetrancia reducida. FRDA se encuentra resaltada pues es el objeto de estudio del presente trabajo.<sup>5</sup>

La enfermedad es progresiva y hacia los 15 años de edad, el paciente requiere silla de ruedas. La muerte en estos pacientes ocurre por miocardiopatía, diabetes o neumonía por aspiración. El promedio de la edad de inicio es a los 10 años y varía entre los 20 y 51 años.<sup>7</sup>

Por la progresión de la FRDA se produce discapacidad y muerte prematura. La mediana del tiempo transcurrido hasta que el paciente queda confinado a una silla de ruedas después del comienzo de la enfermedad es de 11 años (hacia los 20 años de edad). La forma clásica de FRDA se presenta en aproximadamente 75% de los casos con una edad de inicio que oscila entre 20 a 25 años. En los casos restantes existe una forma moderada de la enfermedad que puede clasificarse en 3 categorías: FRDA sin compromiso de los reflejos, FRDA de inicio tardío y FRDA de inicio muy tardío. La esperanza de vida tras el comienzo de la enfermedad se calcula entre 35 y 40 años. La edad de inicio y la progresión están determinados parcialmente por la longitud de la repetición del trinucleótido GAA del alelo más corto; en los pacientes con expansiones mayores, el inicio de la enfermedad es más precoz y la progresión más rápida.<sup>4</sup>

## **2.2 Patología**

Las características más importantes en los estudios anatomopatológicos post-mortem de estos pacientes incluyen degeneración de las vértebras dorsales, de los tractos corticoespinales laterales y espinocerebelosos, ganglios de la raíz dorsal y axones desmielinizados del nervio periférico.<sup>4</sup>

## **2.3 Genética**

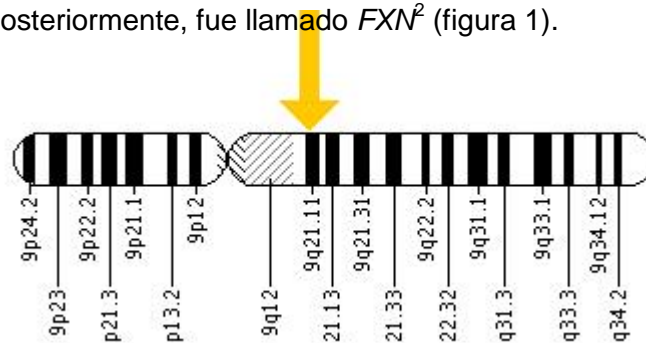
### **2.3.1 Localización cromosómica**

Chamberlain et al.<sup>2</sup> asignó la mutación del gen responsable de la FRDA a la región cromosómica 9p22-cen por ligamiento genético. Un año más tarde, Fujita et al.<sup>4</sup> mostraron una estrecha vinculación a 2 marcadores microsatélites de DNA: D9S15, D9S5 con un valor LOD máximo = 11.36 en la FRDA y un Desequilibrio de Ligamiento máximo = 6.27. Con estos resultados, el marcador D9S5 se asignó a la región distal

del brazo largo del cromosoma 9q12-q13 por hibridación *in situ*. Sin embargo, Shaw et al.<sup>5</sup> emplearon el marcador D9S15 en estudios de hibridación *in situ*, y localizaron el locus FRDA en 9q13-q21.1, con lo que se iniciaron los estudios para encontrar el origen de la enfermedad.

### 2.3.2 Genética Molecular

Montermini et al.<sup>7</sup> localizan una región de 150 kb en el cromosoma 9q13 que representaba al locus de FRDA, mientras que Campuzano et al.<sup>1</sup> identificaron los exones potenciales en la región q13 en el cromosoma 9 mediante la selección de cDNA y análisis de la secuencia. Finalmente, el gen se aisló por este método y se llamo X25 el cual, posteriormente, fue llamado *FXN*<sup>2</sup> (figura 1).

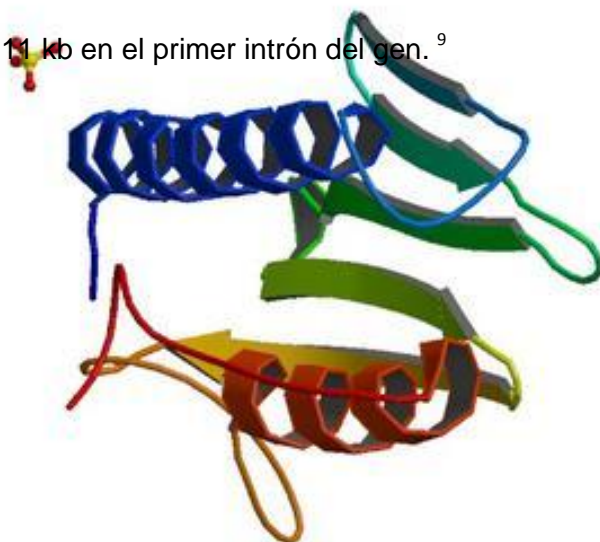


**FIGURA 1.** Cromosoma 9. Se muestra el locus donde se encuentra el gen *FXN*, cuya alteración en el triplete GAA da como resultado la FRDA<sup>13</sup>.

La mayoría de los pacientes (98%) presentan una expansión del triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN* (MIM 606829.0001), la cuál varía entre 7 y 28 unidades de repetidos (Cuadro 2). El 2% de los casos de FRDA se deben a mutaciones puntuales en el gen *FXN* (MIM 606.829), de las cuales hasta ahora se han descrito al menos 15.<sup>1</sup>

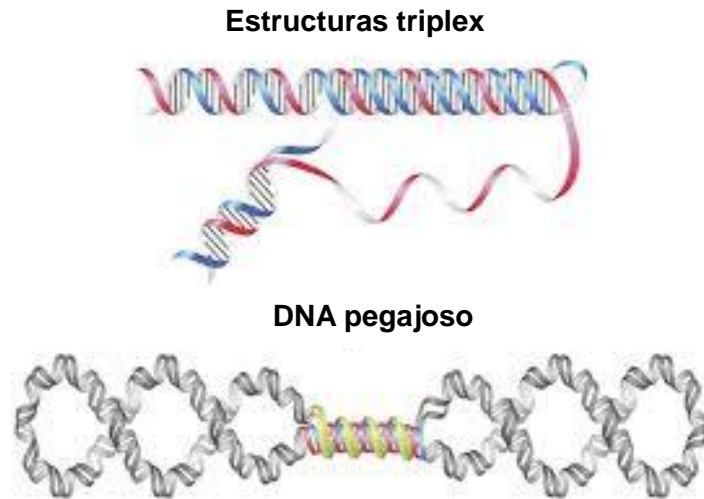
Menos del 4% de los pacientes con FRDA son heterocigotos compuestos con un alelo portador de la expansión de la repetición GAA y otro con una mutación puntual. La longitud de los alelos patológicos en la FRDA varía de 70 a más de 1700 unidades de repetición, pero no hay ningún solapamiento entre el tamaño de los alelos normales y el tamaño de los alelos que se encuentran en FRDA<sup>8</sup>.

Baralle et al.<sup>5</sup> establecieron que el gen *FXN* se encuentra formado por siete exones que abarcan cerca de 80 kb. Bajo condiciones normales, codifican para una proteína de 210 aminoácidos denominada Frataxina (FXN), su estructura se muestra en la figura 2. El trinucleótido repetido GAA se localiza a la mitad de una secuencia Alu, de aproximadamente 11 kb en el primer intrón del gen.<sup>9</sup>



**FIGURA 2.** Estructura 3D monomérica de la proteína Frataxina (82-210 aminoácidos), con ligando de ión sulfato unido electrostáticamente (Uniprot Q16595, Ficha 3T3L de PDB, 2011). Esta estructura fue obtenida por difracción de rayos X, con una resolución de 1.5Å. Se observa que está formada por una plataforma de estructura  $\beta$  plegada y dos  $\alpha$  hélices.<sup>12</sup>

Numerosas investigaciones han revelado la naturaleza polimórfica de esta secuencia por su capacidad de formar estructuras de triple hélice de DNA-RNA, las cuales contienen dos hebras conformadas solo por purinas y una hebra conformada solo por pirimidinas, así como la conjunción de estas estructuras, llamadas DNA sticky (pegajoso), el cual se forma intramolecularmente y que se cree inhibe la transcripción por el secuestro de las polimerasas de RNA, las cuales se unen a dicha estructura. Esta conformación, de acuerdo a estudios recientes, modifica la estructura de las histonas, aumentando su metilación y disminuyendo su acetilación, lo cual determina el grado de transcripción y, por lo tanto, la formación de RNA mensajero para la síntesis de la frataxina.<sup>11</sup>



**FIGURA 3.** Modelos de estructuras del DNA triplex intramolecular del DNA pegajoso (sticky). **Tomada y modificada de Wells R. 2008**<sup>11</sup>

Se ha demostrado que la frataxina se expresa en una gran variedad de tejidos, siendo más abundante en el corazón. Altos niveles de expresión se encuentran también en la médula espinal, los niveles más bajos se detectaron en el cerebelo y no se detectó su expresión en la corteza cerebral.<sup>10</sup>

El grado de disminución de la frataxina depende de la longitud del repetido GAA: el déficit de Frataxina es más pronunciado en pacientes con repeticiones largas, que aquellos en los que tienen sólo expansiones moderadas (menores a 60 repetidos GAA).<sup>4</sup>

El tamaño de las expansiones GAA (y en particular de las más pequeñas de cada par de alelos) se asocia con la frecuencia a padecer cardiomiopatía y pérdida de reflejos en los miembros superiores. Los repetidos GAA son inestables durante la transmisión en la meiosis, por lo tanto, el espectro clínico de la FRDA es más variable, y la prueba molecular directa de la expansión GAA es útil para el diagnóstico, pronóstico y asesoramiento genético. Pianese et al.<sup>8</sup> presentaron datos que sugieren que:

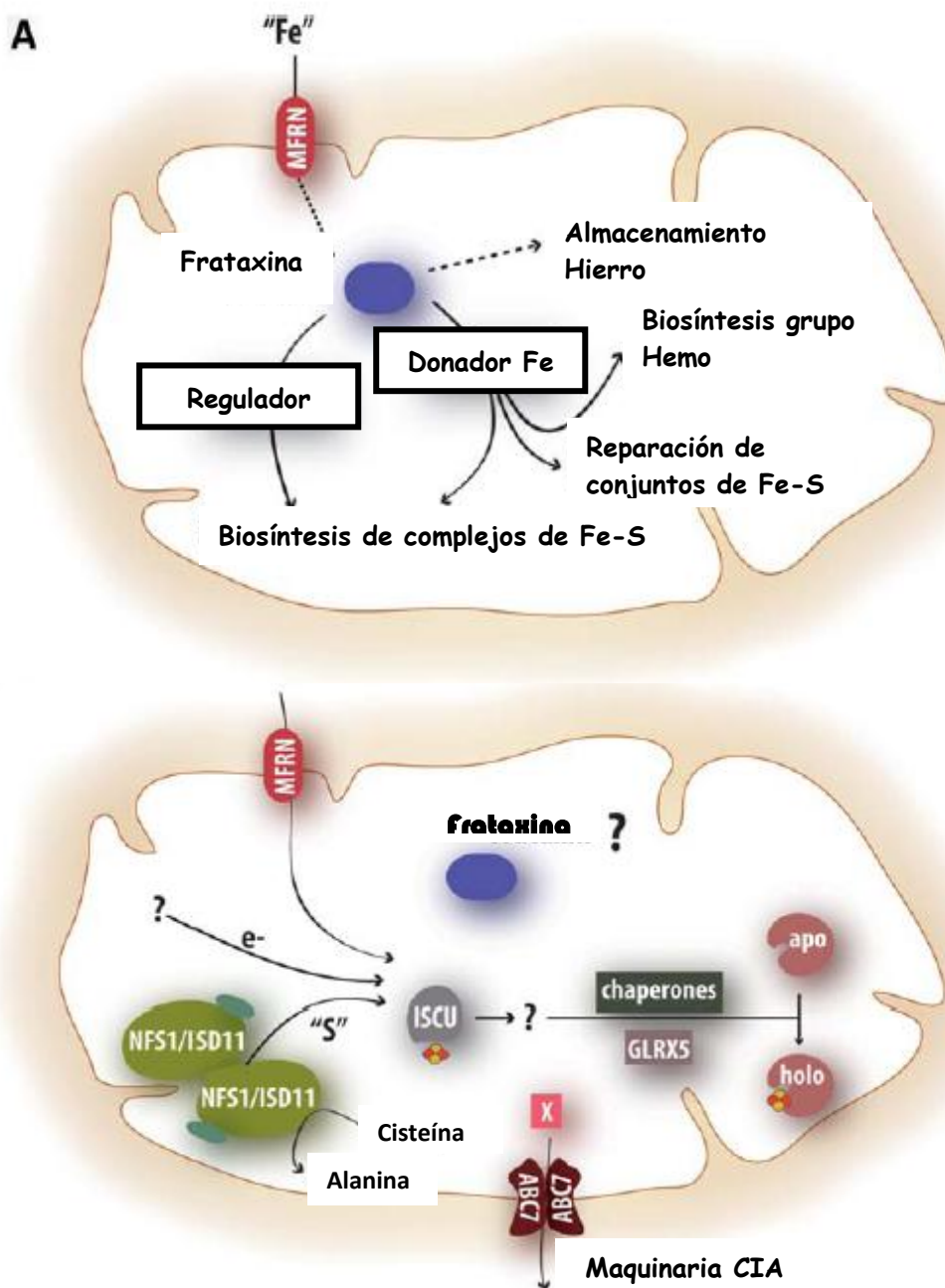
- 1) El repetido GAA en la FRDA es muy inestable durante la meiosis.
- 2) El origen parental y el tamaño de la expansión son factores importantes en la variabilidad de alelos expandidos FRDA.
- 3) La tendencia a contraer o expandir no se ha asociado con haplotipos particulares.<sup>11</sup>

#### **2.4 Función de la proteína**

Se ha estudiado mucho la función fisiológica de la Frataxina en modelos celulares. La Frataxina se ensambla en complejos protéicos más grandes que funcionan como chaperonas de hierro y como proteínas de almacenamiento de este metal. La Frataxina protege así al DNA del daño producido por el hierro. Sin embargo, en los pacientes con FRDA existe una disminución significativa o ausencia del RNA mensajero (mRNA), lo cual a su vez ocasiona ausencia o disminución severa de la proteína Frataxina (valores inferiores al 10% de lo normal) en la médula espinal, el corazón y el páncreas, lo cual se considera como la causa más probable de la degeneración neuronal, la cardiomiopatía y el incremento en el riesgo de desarrollar diabetes mellitus, que se observan en estos pacientes<sup>12</sup>. El déficit de Frataxina tiene como resultado una menor disponibilidad de hierro para la síntesis de complejos de hierro y azufre que constituyen partes esenciales de varias enzimas celulares, como las de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que Frataxina parece ser un activador clave de la conversión de la energía mitocondrial y la fosforilación oxidativa<sup>1</sup>. Se ha sugerido que la disminución de la Frataxina ocasiona daño oxidativo, y también se ha identificado un aumento en el contenido de hierro en el tejido cardiaco de pacientes con FRDA, así como una deficiencia en la actividad de las subunidades que contienen hierro-azufre de los complejos mitocondriales I, II, y III de la cadena respiratoria.<sup>9</sup> La deficiencia de estas enzimas activa el mecanismo oxidativo secundario, lo que produce una sobrecarga de hierro en la matriz mitocondrial y el aumento de radicales libres.<sup>13</sup> En conclusión se sugiere que la FRDA puede ser consecuencia de la



disminución del almacenamiento de hierro mitocondrial debido a la deficiencia de Frataxina, lo que puede afectar el metabolismo del hierro, promover el daño oxidativo y conducir a la progresiva acumulación de hierro, como se muestra en la figura 4.



**FIGURA 4.** Posibles funciones de la Frataxina. **A.** Representación esquemática de las diferentes hipótesis planteadas para describir la función de la Frataxina dentro de la mitocondria. Se ha propuesto que la Frataxina puede actuar como regulador y donador de Fe<sup>2+</sup> en la biosíntesis y reparación de complejos de Fe-S, así como su intervención en la formación del grupo Hemo de la hemoglobina y el almacenamiento de Fe para la célula. **B.** Esquema simplificado del mecanismo de biosíntesis de complejos de Fe-S (ISC) en mamíferos. La biosíntesis de *nov*o de ISC ocurre dentro de la mitocondria donde el azufre es proporcionado por una cisteína desulfurasa, NFS1 la cual interactúa con ISD11, una proteína de función aún desconocida. El hierro y el azufre son ensamblados por la proteína ISCU para dar un ISC, los cuales se transfieren a apoproteínas posiblemente con la ayuda de chaperonas y Glutaredoxina 5 (GLRX5). En paralelo, se ha propuesto que un compuesto sintetizado por la mitocondria, que aún no se ha caracterizado, se transporta al citosol a través del transportador ABC7 localizado en la membrana de la mitocondria. Este compuesto se utiliza por la maquinaria de ensamblaje de ISC para la formación de ISC para proteínas nucleares y del citosol. La reacción requiere electrones y Fe<sup>2+</sup>. El donador de electrones aún es desconocido en mamíferos. Se ha propuesto que la frataxina es el donador de Fe. MFRN: mitoferrina<sup>11</sup>  
Tomada y modificada de Schmuker S. et. al. 2010

## **2.5 Tratamiento**

En esta enfermedad, no existe una cura como tal que detenga su progreso, sólo se administra un tratamiento paliativo, con el fin de aminorar o prevenir los síntomas que presente el paciente en el momento del diagnóstico clínico y conforme evoluciona la enfermedad. Varios estudios abiertos han comprobado que la idebenona (con dosis de 5 mg/kg al día), un análogo de quinona de cadena corta mejora el transporte mitocondrial de los electrones y disminuye la masa del ventrículo izquierdo de los pacientes con FRDA. Los fármacos antiatáxicos como el 5-hidroxitriptófano, la buspirona y la amantadina son ineficaces, o tienen una eficacia escasa en FRDA. En general, se recomienda la implementación de sesiones de fisioterapia. Los pacientes con miocardiopatía y diabetes mellitus deben recibir tratamiento médico convencional.<sup>2</sup>

## **2.6 Diagnóstico molecular**

Para poder realizar el diagnóstico clínico de FRDA, es necesario realizar estudios de gabinete, como son: electromiografía (EMG), que mide la actividad eléctrica de las células musculares; estudios de conducción nerviosa, que miden la velocidad con la cual los nervios transmiten los impulsos; electrocardiograma (ECG), que muestra una presentación gráfica de la actividad eléctrica o del patrón de latidos del corazón; ecocardiograma, que registra la posición y movimiento del músculo cardíaco; imágenes de resonancia magnética (IRM) o tomografía computarizada (TAC), que proporcionan una imagen del cerebro y la médula espinal; punción lumbar para evaluar el líquido cefalorraquídeo; análisis de sangre y orina para verificar niveles aumentados de glucosa, y pruebas genéticas para identificar la mutación presente en el gen.<sup>14</sup>

El diagnóstico molecular se basa en determinar el número de repetidos GAA el cuál es necesario para el pronóstico y asesoramiento genético. Existen diversos métodos por los cuales las ataxias que involucran repeticiones de bases en el DNA pueden confirmarse después del diagnóstico clínico inicial, realizando primeramente un tamizaje por electroforesis capilar de fragmentos de los productos obtenidos por PCR

larga (PCR XL) empleando un triple cebador (TP-PCR), para determinar la presencia de alelos normales y/o mutados. El tamizaje del DNA amplificado por TP-PCR, se realiza a través de la electroforesis capilar (EC) que es una técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño (menos de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro), de ahí que reciba el nombre de capilar. Dentro de este capilar se encuentran la disolución que contiene los analitos o las moléculas a separar y el amortiguador o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente. El triple cebador permite la incorporación de una marca fluorescente la cual se detectará durante la electroforesis capilar, sin embargo este tamizaje tiene limitaciones, ya que para alelos con un gran número de repetidos no se puede determinar adecuadamente su tamaño. Sin embargo, es necesario conocer el número exacto de repetidos en el gen, por lo que se requiere de un método más preciso como la técnica de Southern blot por el cual se puede determinar el tamaño de los repetidos y con base a éste, predecir la severidad que tendrá la enfermedad<sup>15</sup>.

La técnica de hibridación de DNA o *Southern Blot* denominada así en honor al biólogo británico Edwin Southern, quien la desarrolló en 1975, se emplea para identificar fragmentos específicos de DNA en una mezcla compleja. La técnica de Southern Blot requiere de la electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar los fragmentos de DNA (en este caso, obtenidos por PCR XL) de acuerdo a su longitud y, después, se lleva a cabo la transferencia a un soporte sólido o membrana en la cual se efectúa la hibridación del DNA con una sonda específica, cuya unión se da por complementariedad de bases al fragmento de interés. En la figura 5 se muestra de forma resumida éste procedimiento.<sup>12</sup>

Los alelos del gen *FXN* se clasifican de acuerdo al intervalo de tamaños de la siguiente forma<sup>27</sup>:

**Alelos normales:** La repetición del triplete GAA es de 7 a 28 repetidos. Hay que destacar que más del 80% de los alelos presentan una repetición menor a 12, siendo

las repeticiones superiores a 27 bastante raras y estos valores varían de acuerdo a la población estudiada.

**Alelos premutados:** Se trata de aquellos que contienen alelos con un número de repetidos del triplete GAA entre 34 y 65. Estos alelos premutados no se asocian con el fenotipo de FRDA, es decir, el individuo portador de los mismos puede permanecer asintomático, pero puede tener hijos enfermos debido a que durante la transmisión a la descendencia, se puede producir una expansión en el tamaño de la repetición, dando lugar a alelos patológicos.

En algunas ocasiones, los alelos que presentan una repetición mayor de 27, presentan interrupción en la secuencia (GAGGAA). Algunos autores han señalado que esta interrupción, sirve para estabilizar a los alelos premutados, evitando su expansión. Sin embargo, no existen evidencias que relacionen estas interrupciones con un significado clínico específico.

**Alelos expandidos:** Se trata de aquellos alelos que presentan un tamaño o número de repetición del triplete entre 66 y 1700 veces. La mayoría de los pacientes con FRDA presentan una expansión del repetido que se encuentra alrededor de 120. Algunos autores señalan que existe una relación inversa entre el número de repeticiones del triplete GAA, y la edad en que los signos y síntomas se van a presentar en los pacientes, ya que a mayor número de repetidos la edad de inicio disminuye. Así, la cantidad de mRNA que se va a formar puede depender del número de tripletes repetidos.

Además, existen otras causas que pueden provocar que el gen *FXN* se encuentre mutado. Entre éstas se encuentran mutaciones puntuales y errores en el “corte y empalme” (de su traducción en inglés, *splicing*). Por lo que hay que señalar que en menos del 1% de los pacientes que reúnen los criterios diagnósticos de FRDA, no presentan una expansión del triplete GAA.<sup>15</sup>

Todos los pacientes con este tipo de ataxia tienen por lo menos un alelo con expansión del trinucleótido GAA y 98% son homocigotos para esta expansión<sup>1</sup>. Sin

embargo, existe un 5% de pacientes heterocigotos compuestos con FRDA en los que se presenta una combinación de una expansión GAA en un alelo y una mutación puntual en el otro. Esta mutación puntual puede ser “sin sentido” (aquellas que introducen un codón de terminación y dan lugar a proteínas truncadas) o de “sentido erróneo” (aquellas en las que el cambio de un sólo nucleótido conduce a la sustitución del aminoácido). La mayoría de los pacientes heterocigotos compuestos presenta el cuadro clínico típico de FRDA. Son excepciones las mutaciones de sentido erróneo, como la mutación D122Y y G130V, que se han asociado a las formas atípicas de FRDA, que presentan reflejos conservados (Ataxia de Friedreich con Reflejos Conservados, sus siglas en inglés FARR), sin disartria o con ataxia moderada y progresión lenta, pero no con la variante de inicio tardío<sup>11</sup>.

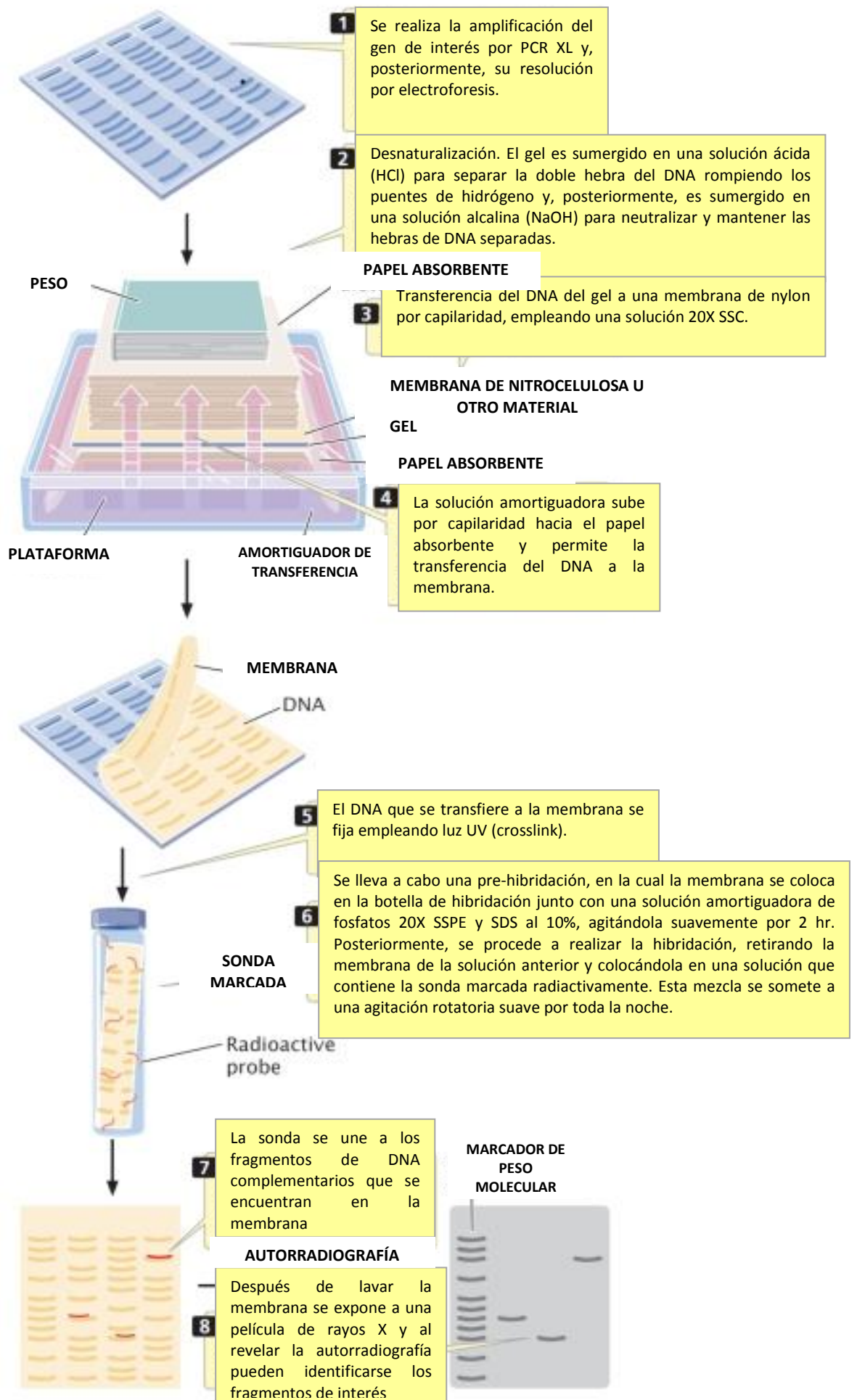


FIGURA 5. Procedimiento que se lleva a cabo en la técnica de *Southern Blot*.<sup>27</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La determinación o identificación de marcadores polimórficos y mutaciones necesarios para realizar el diagnóstico molecular requiere de una tecnología más precisa, reproducible y automatizada, como la electroforesis capilar, que contribuye, principalmente, en dos áreas del diagnóstico genético: secuenciación y análisis de fragmentos, mientras que las técnicas como la electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida tienen ventajas y desventajas, pues consumen más tiempo y recursos, son menos específicas y reproducibles, y suelen requerir mayor cantidad de muestra, así como requieren de personal con experiencia para su realización. La confirmación a través del diagnóstico molecular para enfermedades neurodegenerativas que involucran repeticiones cortas en el DNA, puede realizarse por diferentes técnicas empleadas en biología molecular, como la PCR de punto final, sin embargo, se encuentran limitadas para enfermedades como la FRDA, que involucran repeticiones de DNA de un mayor tamaño (1 a 3 kilobases o más), por lo que es necesario establecer nuevas estrategias que nos permitan amplificar fragmentos de mayor tamaño y de esta manera poder establecer el número de repetidos presentes en el DNA del paciente, con el fin de dar un diagnóstico preciso y de establecer en el laboratorio diferentes estrategias metodológicas que faciliten y permitan un menor tiempo para realizar el diagnóstico de enfermedades por expansión de repetidos.

La identificación de los pacientes con expansión del repetido GAA será una prueba útil no sólo para la implementación del diagnóstico molecular sino también proporcionará información del tipo de alelos presentes en los pacientes, ya que de este depende la severidad de los síntomas y abre el camino para que en un futuro se realicen esfuerzos adicionales para investigar el papel de la Frataxina en la biosíntesis del grupo hemo o almacenamiento de hierro. Por otra parte, dará lugar al conocimiento de la distribución y el tipo de alelos que están presentes en la población mexicana afectada con FRDA, así como una mejor comprensión de los mecanismos



involucrados en el proceso neurodegenerativo, además de dar un asesoramiento genético oportuno a estas familias.

Es por esto que en el Depto. de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, resulta de gran importancia implementar el diagnóstico molecular de la ataxia recesiva más frecuente. En México, no contamos con un laboratorio que realice este análisis, solo se realiza en laboratorios privados del extranjero, a los cuales no toda la población tiene acceso debido al costo elevado y ubicación, por lo que es de gran importancia que se realice en una institución de salud que beneficie a un amplio sector de la población.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el tamaño del expandido (GAA)<sub>n</sub> en el intrón 1 del gen *FXN*, en pacientes que presentan ataxia con un patrón de herencia autosómica recesiva.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Implementar la técnica de PCR larga para amplificar fragmentos de DNA que van de 1 a 3kb
- ✓ Implementación y estandarización de una prueba de tamizaje rápido por medio de PCR triple cebador (TP-PCR), para el análisis por electroforesis capilar, que permitirá la identificación de individuos homo y heterocigotos para el gen *FXN*.
- ✓ Implementación y estandarización de la técnica de Southern Blot para la confirmación del resultado del tamizaje y poder establecer el tamaño aproximado del repetido GAA para muestras con alelos expandidos grandes.

## **5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

La mayor parte de los pacientes a los cuales se les realizará el diagnóstico molecular como prueba confirmatoria de FRDA resultarán tener una expansión grande en ambos alelos, debido a que el modo de herencia que presentan es autosómico recesivo, por lo que deben presentar ambos alelos mutados y se identificarán por análisis de fragmentos por electroforesis capilar y por la técnica de Southern Blot, dependiendo del tamaño que presenten.

## **6. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se analizaron los pacientes referidos de la consulta de Neurología y Genética del INNNMVS, que cumplieron los criterios clínicos de probable FRDA y que aceptaron participar en el proyecto, previo consentimiento informado, durante el período de enero de 2011 a marzo de 2012. Hasta la fecha se recibieron 22 pacientes con diagnóstico clínico de probable FRDA, hombres y mujeres de 18 a 30 años de edad.

## **7. CRITERIOS**

### **7.1 Criterios de inclusión**

Pacientes que presentaron y cumplieron con los criterios clínicos y neurológicos característicos de FRDA como: arreflexia, debilidad muscular, respuesta plantar extensora (signo de Babinski), signos de disfunción de la región dorsal y trastornos atáxicos del habla (disartria), así como se tomó en cuenta el tiempo de progresión e inicio de la sintomatología de la enfermedad, la debilidad muscular, así como la presencia de antecedentes familiares, sugestivos de un patrón de herencia autosómico recesivo .

### **7.2 Criterios de exclusión**

Pacientes que no cumplieron con los criterios clínicos característicos de FRDA, aunque presentaran datos clínicos de ataxia.

### **7.3 Criterios de eliminación**

Pacientes que no presentaron sintomatología clásica o se descartó otro tipo de ataxia y que no aceptaron participar en el estudio.

### **7.4 Variables**

La variable independiente de este trabajo, fue el número de tripletes repetidos GAA, presentes en los pacientes con FRDA, pues la cantidad de éstos puede no ser la misma en cada alelo, mientras que la variable dependiente, será la evolución de la enfermedad en el paciente, pues ésta se da de acuerdo al número de repeticiones del triplete GAA presentes en cada alelo.

## 8. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se implementaron dos técnicas para la identificación de alelos normales y mutados presentes en FRDA, las cuales podrán ser útiles para otras enfermedades que involucran trinucleótidos repetidos. Así pues se implementó la técnica de PCR con triple cebador (TP-PCR), originalmente desarrollada por Warner et al<sup>30</sup>, para la detección de alelos expandidos en la distrofia miotónica. El ensayo de PCR utiliza un cebador específico de locus que flanquea la secuencia variable de trinucleótidos, junto con cebadores apareados, amplificando la región del repetido desde múltiples sitios de cebado. La especificidad está determinada por la etiqueta fluorescente (tag), específica del locus cebador. TP-PCR genera una escalera característica en la traza de fluorescencia que permite la identificación de repeticiones patógenicas de gran tamaño, que no se pueden amplificar utilizando únicamente los cebadores flanqueantes utilizados en la PCR de punto final.<sup>31</sup>

Posteriormente se empleó la técnica de Southern Blot para confirmar los resultados del análisis de fragmentos, realizado por electroforesis capilar primeramente como forma de tamizaje, (lo que permitirá determinar sólo la presencia de alelos normales y mutados). Con el Southern Blot se podrá determinar el número aproximado de repetidos (GAA)<sub>n</sub> en alelos con grandes repeticiones, y con esto, confirmar el diagnóstico clínico de probable FRDA, además de analizar los antecedentes familiares para descartar la posibilidad de cualquier otro tipo de ataxia recesiva.

## 9. DISEÑO METODOLÓGICO

### 9.1 MATERIAL

- Microtubos para centrifugación de 0.6 mL y 1.5 mL Eppendorf®
- Tubos para reacción de PCR, tapa plana de 0.2 mL Axygen®
- Base plástica para termociclador (96 pozos)
- Puntas para micropipeta de 10 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Vaso de precipitados Pyrex® 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL y 1 L
- Probeta graduada Pyrex® de 10 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL y 1 L
- Matraz aforado Pyrex® de 1 L y 2 L
- Recipiente de vidrio grande
- 2 esponjas medianas
- Varilla de vidrio
- Membrana de nylon cargada positivamente GE Healthcare®
- Papel filtro Whatman para electroforesis 3MM
- Pinzas grandes de acero inoxidable
- Recipiente grande con capacidad para 1 Kg
- Espátula de acero inoxidable
- Gasas
- Guantes de látex
- Gradilla de plástico para tubos de 1.5 mL
- Barra magnética para agitación
- Papel aluminio
- Bolsas plásticas medianas con cierre hermético Ziploc®
- Componentes del equipo iBlot®:

- iBlot® DNA Cátodo (arriba)
  - iBlot® DNA Ánodo (abajo)
  - iBlot® DNA Esponja Desechable
  - iBlot® Papel filtro
- Cartucho para placas radiográficas Hyperfilm®
  - Placas radiográficas Hyperfilm® X-OMAT o Kodak®

## **9.2 INSTRUMENTOS**

- Balanza analítica Denver Instrument Company® AA-200
- Termómetro de Inmersión parcial (-20 a 150° C) Brannan®
- Micropipetas de volumen variable de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Espectrofotómetro UV- Vis de micro-volumen para ácidos nucleicos y proteínas Nanodrop 2000®
- Analizador de DNA por Electroforesis capilar. Secuenciador modelo AB3031. Applied Biosystems®

## **9.3 EQUIPOS**

- Temociclador GeneAmp® PCR System 9700. Applied Biosystems
- Termociclador Thermal cycler® 2720. Applied Biosystems
- Fijador de DNA CL-1000 Ultraviolet Crosslink UVP®
- Transiluminador DyNA® Light Dual Intensity UV. Labnet
- Microcentrífuga Minispin® Eppendorf
- Fuente de poder para electroforesis Thermo® Electron Corporation 3000P
- Cámara de electroforesis Thermo EC Maxicell Primo® EC340

- Estufa de Hibridación con frascos de vidrio y tapa plástica Robbins Scientific® modelo 400
- Parrilla de calentamiento y agitación (25 a 500° C) Corning®
- Centrífuga refrigerada 5810R Eppendorf
- Agitador Vórtex Genie-2 (600 a 3200 rpm) Daigger® Lab Tech
- Concentrador al vacío Speed Vac® Eppendorf
- Incubadora con agitación (-5 a 99° C; 300 a 1500 rpm) Thermomixer comfort® Eppendorf
- Agitador orbital (10 a 400 rpm) Lab-line®
- Refrigerador TopMount RT32YHPN5/XEM Samsung®
- Horno de microondas AMW9144ST Samsung®
- Sistema de Transferencia en seco de DNA y proteínas iBlot® Invitrogen
- Fotodocumentador de luz UV-visible-infrarrojo Biorad®
- Detector Geiger para monitoreo de fuentes radiactivas.

#### **9.4 REACTIVOS Y SOLUCIONES**

- Amortiguador de Lisis de Glóbulos Rojos (BLGR): 8.29 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  J. T. Baker®; 1 g  $\text{KHCO}_3$  Merck®; 0.37 g EDTA J. T. Baker®. Se mezcla y afora a 1 L con agua estéril y se ajusta pH 8.0. Se filtra al vacío. Almacenar a 4° C
- Cloruro de Sodio (NaCl) 5mM: 0.02925 g NaCl J.T. Baker®. Se mezcla y afora a 100 mL con agua bidestilada.
- Cloruro de Sodio (NaCl) 7M: 40.95 g NaCl J. T. Baker®. Se mezcla y afora a 100 mL con agua bidestilada. Se esteriliza en autoclave.
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%: 100 g SDS Biorad® se mezclan con 900 mL de agua bidestilada, calentando gradualmente hasta 68° C



para disolver completamente. Se deja enfriar y se afora a 1 L. Se ajusta a pH 7.2 con HCl concentrado Merck®. Se esteriliza en autoclave.

- Cloroformo-Alcohol Isoamílico 49:1: para preparar 100mL, se miden 98 mL de cloroformo J.T. Baker® y 2 mL de alcohol isoamílico J.T. Baker® se mezclan por inversión en un frasco ámbar, dejando salir gradualmente los gases generados (Realizar en campana de extracción). Almacenar en frasco ambar a 4° C.
- PBS [Amortiguador de fosfatos en solución salina] 1X: 8 g NaCl J.T. Baker®; 0.2 g KCl J.T. Baker®; 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Merck®; 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> J.T. Baker®. Se mezcla y afora a 1 L con agua bidestilada y se ajusta pH 7.4. Se esteriliza en autoclave y se almacena a 4° C.
- Solución para conservación de células blancas *RNA later* Ambion®
- Estuche comercial para Análisis de Fragmentos True Allele® PCR Premix, de Applied Biosystems®
- Kit comercial *Long PCR Enzyme Mix* Fermentas® que contiene:
  - ✓ Long PCR Enzyme Mix 5 U/μL
  - ✓ Amortiguador 10X Long PCR
  - ✓ Amortiguador con MgCl<sub>2</sub> 1.5mM Long PCR
  - ✓ MgCl<sub>2</sub> 25 mM
  - ✓ Agua libre de nucleasas
  - ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Kit comercial *Long Range Hot Start* KAPA® que contiene:
  - ✓ KAPA Polimerasa 2.5 U/μL
  - ✓ Amortiguador (sin Mg<sup>2+</sup>)5X KAPA Long Range
  - ✓ Mezcla de dNTP's 10mM

- ✓  $\text{MgCl}_2$  25 mM
- Desoxinucleotidos trifosfatados (dNTP's): dATP 10 mM; dTTP 10 mM; dGTP 10 mM; dCTP 10 mM Roche® Applied Biosystems
- Amortiguador de corrimiento para electroforesis TBE 10X (Tris 0.89 M; Ácido Bórico 0.89 M; EDTA 0.02 M: 108 g Tris Base Biorad®; 55 g Ácido bórico J.T. Baker®; 40 mL EDTA 0.5 M pH 8. Se mezclan y aforan a 1 L con agua bidestilada. Se filtra solución al vacío.
- Bromuro de Etidio Sigma-Aldrich® (10 ug-uL
- Amortiguador Tris 1M pH 7.4: 121.1 g Tris Biorad®; 70mL HCl Merck®. Se mezclan en 900 mL de agua bidestilada y se ajusta pH. Posteriormente se afora a 1 L y se esteriliza en autoclave.
- Ácido Etilendiamino Tetrasódico (EDTA) 0.5 M pH 8: 186.1 g EDTA J.T. Baker®. Se disuelven en 800 mL de agua bidestilada y se ajusta pH con aproximadamente 20 g de NaOH J.T. Baker®. Se afora a 1 L. y se esteriliza en autoclave.
- Solución de NaCl 5 M: 292.2 g NaCl J.T. Baker® se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se afora a 1 L y se esteriliza en autoclave.
- Amortiguador 20X SSC (NaCl 3 M; Citrato de sodio 0.3 M): 175.3 NaCl J.T. Baker®; 88.2 g Citrato de sodio J.T. Baker®. Se mezclan en 800 mL de agua bidestilada y se ajusta el pH a 7 con solución de NaOH 10 N. Se afora a 1 L y se esteriliza en autoclave.
- Desoxicitidina 5'-trifosfato [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] 250 uCi (9.25 MBq); 3000 Ci/mmol (111 TBq/mmol), con 0.025 mL de colorante verde Tricina 50 mM (pH 7.6) Perkin Elmer® EasyTides®

- Adenosina 5'-trifosfato [ $\gamma$ - $^{32}$ P] 250  $\mu$ Ci (9.25 MBq); 3000 Ci/mmol (111 TBq/mmol), con 0.025 mL de colorante verde Tricina 50 mM (pH 7.6) Perkin Elmer® EasyTides®
- Amortiguador 20X SSPE: 174 g NaCl J.T. Baker®; 27.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck®; 7.4 g EDTA J.T. Baker®. Se disuelven en 800 mL de agua bidestilada y se ajusta pH a 7.4 con solución de NaOH 10 N. Se afora a 1 L y se esteriliza en autoclave.

## 9.5 METODOLOGÍA

Se realizó la estandarización de la técnica de Southern Blot, para lo cual se requiere de procesos previos como:

### 9.5.1 AISLAMIENTO DE DNA

Se realizó la extracción de DNA y preservación de células mononucleares a partir de sangre periférica utilizando un amortiguador de Lisis de Glóbulos Rojos (BLGR), según la técnica de Cuevas-Covarrubias, modificado de Buffone y Darlington; Millar y Polensky; Maniatis y Fritsch, establecida en el Depto. de Neurogenética del INNNMVS.

En el método utilizado para la extracción de DNA genómico se empleó el amortiguador de lisis BLGR [NH<sub>4</sub>Cl 0.15 M; KHCO<sub>3</sub> 0.01 M; EDTA 0.5 M pH 8.0]. Los glóbulos rojos de 3 mL de sangre periférica se lisaron con el amortiguador antes mencionado. Los leucocitos se separaron por centrifugación selectiva a 3000 rpm/6 min. Se decantó el sobrenadante y se repitieron los lavados con solución de lisis hasta obtener un botón blanco, libre de eritrocitos. Al botón limpio, se le adicionó cloruro de sodio a diferentes concentraciones para eliminar las proteínas

remanentes: se agregaron 570  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 mM, se homogenizó la solución por 2 min., se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de un detergente catiónico fuerte, SDS (Dodecil Sulfato de Sodio pH 7.2) al 10% (v/v) y se homogenizó con vórtex por 5 min. Finalmente se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 7 M (saturado) y se homogenizó durante 10 min. Las proteínas se separaron por centrifugación a 11500 rpm/20 min. Se realizó un paso de extracción con 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo-alcohol isoamílico (proporción 49:1) y se centrifugó a 14000 rpm/15 min. Los ácidos nucleicos se aislaron de la fase acuosa, precipitándolos con 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Se centrifugó a 14000 rpm/10min y se decantó el sobrenadante. El DNA se lavó con 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%; se centrifugó a 14000 rpm/15 min. y se decantó sobrenadante. La muestra se secó con vacío, para evaporar el alcohol remanente y se resuspendió en agua estéril (100-300  $\mu\text{L}$ ). Se incubó a 60° C por 1 hora para disolver completamente el botón antes de utilizarse para las pruebas posteriores.

#### **9.5.1.2 LISIS Y ALMECENAMIENTO DE GLÓBULOS BLANCOS (BUFFY COAT)**

Los glóbulos rojos de 3-6 mL de sangre periférica restantes, se lisaron con el amortiguador de lisis BLGR. Las células blancas se separaron por centrifugación a 3000 rpm/6 min y se decantó el sobrenadante. Se realizaron varios lavados de las células con el BLGR hasta obtener un botón limpio de eritrocitos. Las células se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de PBS [*amortiguador de fosfatos en solución salina*] 1X (NaCl 0.13M; KCl 0.002M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0017M] y 250  $\mu\text{L}$  del preservador comercial *RNA later*®. Se homogenizó la solución. Se almacenaron las

células a  $-70^{\circ}$  C hasta que se requiriera una nueva extracción de ácidos nucleicos.

### **9.5.1.3 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL DNA**

Se llevó a cabo el análisis cualitativo del DNA obtenido en la extracción, en geles de agarosa al 1% (teñidos con Bromuro de Etidio como intercalante/revelador que permite visualizar el DNA a una concentración de  $1\mu\text{L}/100\text{mL}$  de gel, adicionado directamente) y cuantitativo por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280 nm (Nanodrop®).

### **9.5.2 TAMIZAJE POR ANALISIS DE FRAGMENTOS E IMPLEMENTACIÓN DE PCR PARA FRAGMENTOS LARGOS**

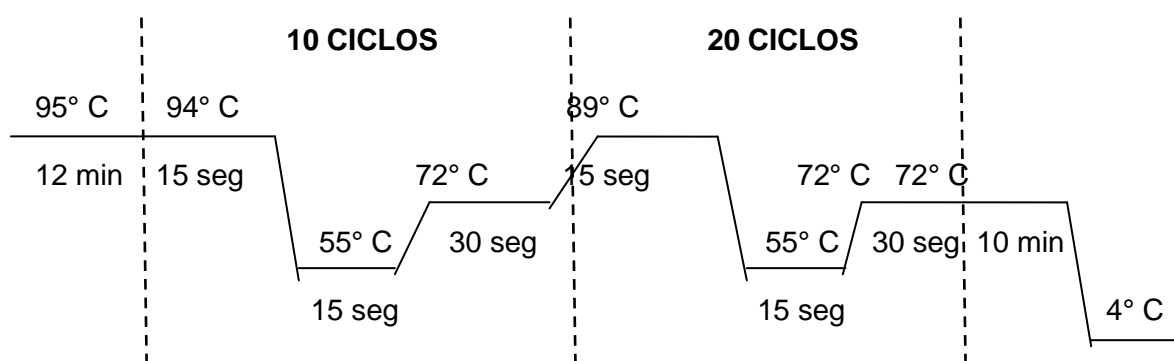
Se realizó por análisis de fragmentos un tamizaje del DNA amplificado por TP-PCR; las cantidades de cada componente del estuche comercial utilizado y el programa se muestran en el cuadro 3 y la figura 6, respectivamente. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este análisis son los siguientes, tomados de Campuzano et. al. 2006:

**Forward:** 5'-GGAGGGATCCGTCTGGGCAAAGG-3'      **Tm:**  $60^{\circ}$  C

**Reverse:** 5'-CAATCCAGGACAGTCAGGGCTTT-3'      **Tm:**  $55^{\circ}$  C

**CUADRO 3.** Se muestran los componentes de la mezcla de reacción empleados, tomados del kit Tru Allele® de Applied Biosystems (el DNA no se incluye en el kit).

Componente	Cantidad (µL)
DNA (100 ng/µL)	1.5
Agua cbp 12.5µL	0.38
Tru Allele Premix	7.5
Fluoróforo (F*)	0.78
Oligo Forward	1.56
Oligo Reverse	0.78
Volumen final	12.5



**FIGURA 6.** Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región del repetido GAA contenido en el intrón 1 del gen *FXN*, tomando en consideración las recomendaciones del proveedor del kit comercial de Fermentas®. Los oligonucleótidos utilizados generan un producto de 1.5kb.

Al concluir la reacción, las muestras se colocaron en una placa de secuenciación de 96 pozos, donde se adicionaron: 2 µL de producto de PCR XL, 9 µL de Formamida Ultrapura, 1 µL de Marcador de Peso Molecular fluorescente de 500pb. Se mezclaron y se desnaturalizaron las muestras a 96° C por 5 min. Al terminar, se colocaron en el analizador de DNA de Applied Biosystems® (Secuenciador modelo AB3031), para realizar su separación por electroforesis capilar. Los resultados se analizaron utilizando el programa GeneMapper® 4.0. Las muestras que presentaron una expansión anormal, se

analizaron y fueron confirmadas por la técnica de Southern Blot para determinar el número de repetidos GAA presentes en cada uno de los alelos.

### 9.5.3 PCR PARA FRAGMENTOS LARGOS EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT

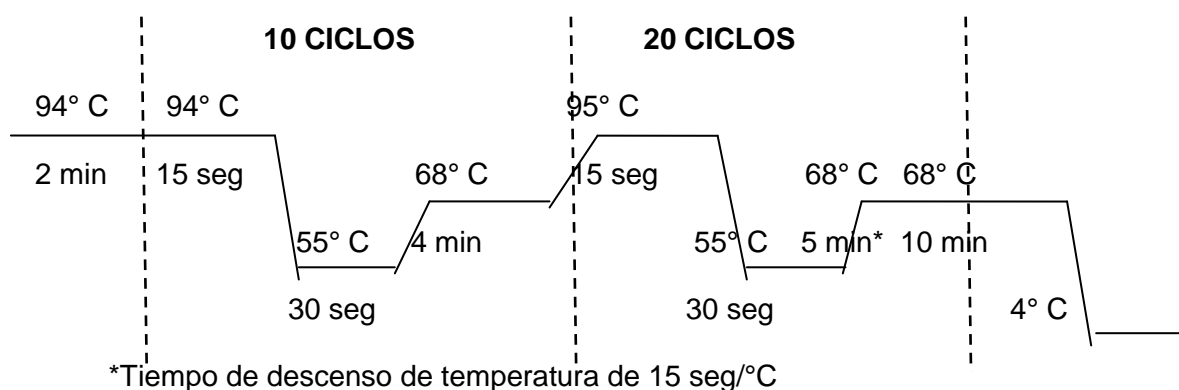
Se estandarizó la PCR para fragmentos largos (XL) que se analizarán por la técnica de Southern Blot, empleando los kit comerciales *Long PCR Enzyme Mix* de la marca Fermentas® y *Long Range Hot Start* de la marca KAPA®. Se realizaron diversas pruebas para ajustar condiciones y concentraciones de los componentes de la reacción y se determinó que la Tm empleada sería de 55° C. Las temperaturas y tiempos, así como los ciclos que se establecieron desde el inicio de las pruebas, se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, y se pueden observar en las figuras 7 y 8. Las cantidades utilizadas para la mezcla de reacción, incluidos en los estuches comerciales utilizados se muestran en los cuadros 4 y 5. La secuencia de los cebadores utilizados<sup>33</sup> (Invitrogen®), los cuales generaron un producto de 446 pb, son:

**Forward (F) 147:** 5'-GAAGAACTTTGGGATTGGTT-3'      Tm: 48.71° C

**Reverse (R) 602:** 5'-TTTTCCAGAGATGCTGGGAAA-3'      Tm: 51.53° C

**CUADRO 4.** Se muestran las cantidades utilizadas de cada componente incluido en el kit de Fermentas® (el DNA no se incluye en el kit).

Componente	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	5
Agua cbp 25 $\mu\text{L}$	13.35
Buffer 10X/MgCl <sub>2</sub>	2.5
2mM dNTP's mix	2.5
Oligo F 147 (50 mM)	0.2
Oligo R 602 (50 mM)	0.2
DMSO	1
Enzima PCR XL (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25
Volumen final	25

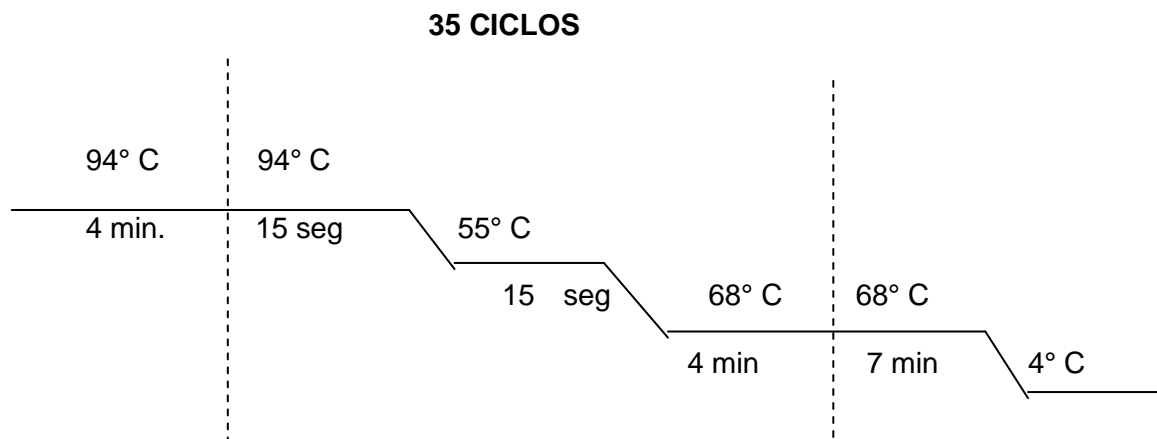


**FIGURA 7.** Programa utilizado para la amplificación de la región del repetido GAA contenido en el intrón 1 del gen *FXN*, tomando en consideración las recomendaciones del proveedor del kit comercial de Fermentas®. Los oligonucleótidos utilizados generaron un producto de 446pb en las muestras que no presentaron una expansión anormal del trinucleótido GAA.



**CUADRO 5.** Se muestran las cantidades utilizadas para la reacción de PCR XL a partir del kit comercial de la marca KAPA® (el DNA no se incluye en el kit).

Componente	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	8
Buffer KAPA 5X (sin $\text{MgCl}_2$ )	5
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	1.75
dNTP's mix (10 mM c/u)	0.75
Oligo F 147 (10 mM)	1.25
Oligo R 602 (10 mM)	1.25
Agua cbp 25 $\mu\text{L}$	6.75
KAPA Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25
Volumen final	25



**FIGURA 8.** Programa utilizado para la amplificación de la región del repetido GAA contenido en el intrón 1 del gen *FXN*, tomando en cuenta las recomendaciones del proveedor del estuche comercial de la marca KAPA®. Los oligonucleótidos empleados generaron un producto de 446pb en las muestras que no presentaron expansión anormal del trinucleótido GAA.

#### 9.5.4 ELECTROFORESIS DE FRAGMENTOS LARGOS

1. Se verificó la presencia de los productos de PCR XL, en un gel de agarosa al 0.8% (con Bromuro de Etidio, a una concentración de 10 ug/uL). La electroforesis se realizó empleando el amortiguador TBE 1X (Tris 0.89 M; Acido Bórico 0.89 M; EDTA 0.5 M pH8) aplicando un voltaje de 100 V por 1h. Se analizó el gel en un Transiluminador UV.
2. Para realizar la **transferencia tipo Southern Blot**, se realizó la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa al 2%, para la mejor separación de los productos (se incluyó Bromuro de Etidio en el gel a una concentración de 10ug/uL) se empleó un marcador de peso molecular Ladder DNA Marker, de Axygen® que va desde 300 a 10000 pb, para identificar el fragmento de interés. El corrimiento electroforético se realizó a 40V con amortiguador TBE 1X (40V/TBE 1X) durante toda la noche (Figura 9).



**FIGURA 9.** Separación de los productos por electroforesis en gel de agarosa al 2%/TBE 1X

### 9.5.5 TRANSFERENCIA TIPO SOUTHERN BLOT

1. Concluido el corrimiento electroforético, se analizó el gel en un transiluminador UV para confirmar la separación de los productos y del marcador de peso molecular conocido. Después se transfirieron los fragmentos de DNA a una membrana de Nylon. La transferencia se llevó a cabo por medio de dos procedimientos: utilizando el equipo iBlot® para realizar la transferencia en seco y por carga eléctrica o realizando la trasferencia del DNA por capilaridad.
2. El gel de agarosa se sometió previamente a una depurinación, desnaturalización y neutralización (los tiempos de agitación para el gel y composición de cada solución se describen en la pag. 48). Posteriormente, se colocó sobre un sistema de transferencia en seco, empleando el equipo iBlot (figura 10), o montando un sistema que permitió la transferencia por capilaridad empleando el amortiguador 20X SSC (figura 12).
3. Para llevar a cabo la transferencia del DNA en seco con aplicación de voltaje por medio del equipo iBlot® se realizó lo siguiente:
  - ✓ Se colocó el equipo sobre una superficie plana y se levantó la tapa.
  - ✓ Se retiró el plástico protector del ánodo y se mantuvo en una charola de plástico; se colocó sobre el equipo en el área designada (alineándolo con las marcas en la superficie).
  - ✓ Se colocó el gel de agarosa con los pozos hacia arriba, sobre el ánodo (el cual contiene la membrana de nylon), y se retiraron las burbujas que se generaron entre el gel y el ánodo, con ayuda de un rodillo.
  - ✓ Se colocó una hoja de papel filtro (previamente humedecido con agua bidestilada) sobre el gel y se retiraron las burbujas con ayuda del rodillo. Se cortó la esquina superior derecha del gel y la membrana, como referencia de la posición del gel.

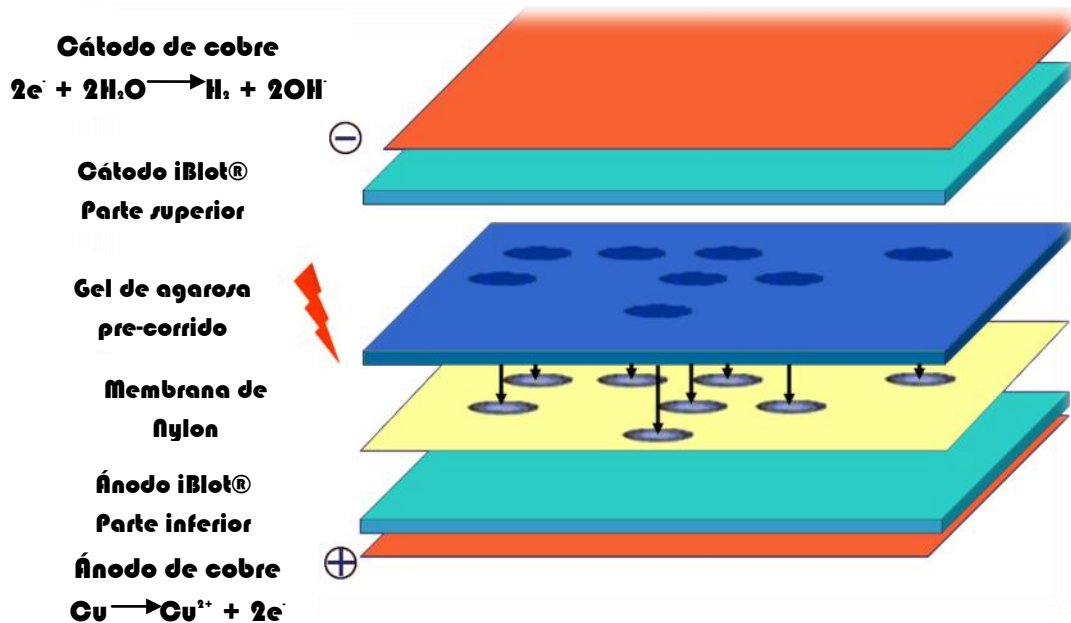
- ✓ Se retiró el plástico protector y la charola de plástico del cátodo y se colocó sobre el papel filtro, retirando las burbujas con el rodillo.
- ✓ Se colocó la esponja recolectora en la cara interna de la tapa y se cerró el equipo. Se revisó que la luz del equipo se encendiera, para saber que el circuito se había cerrado.
- ✓ Se seleccionó el programa estándar de transferencia pre-programado en el equipo (programa 8), el cual tiene las siguientes características:
  - 20 v por 2 min.                      7 min. para comenzar programa
  - 23 v por 2 min.
  - 25 v el resto del tiempo            13 min. para realizar el proceso
- ✓ Se encendió el aparato (presionando el botón Start/Stop), y se observó un cambio en el color de la luz del equipo de rojo a verde, la cual se mantiene encendida hasta que el programa concluyó.



**FIGURA 10.** Equipo iBlot® de Invitrogen, para realizar la transferencia de DNA o proteínas, en seco aplicando voltaje.

- ✓ Al terminar el programa, se mantuvo presionado el botón Start/Stop hasta que la luz roja dejó de parpadear. Se retiró el gel del aparato y se

llevó al Transiluminador UV donde se verificó que la transferencia fuera completa y, de ésta manera se confirmó que las muestras ya no estuvieran presentes en el gel. En la figura 11 se muestra la forma en que se montó la membrana, el gel y los electrodos para realizar la transferencia.



**FIGURA 11.** Principio en el cuál se basa el equipo iBlot® para realizar la transferencia de DNA.

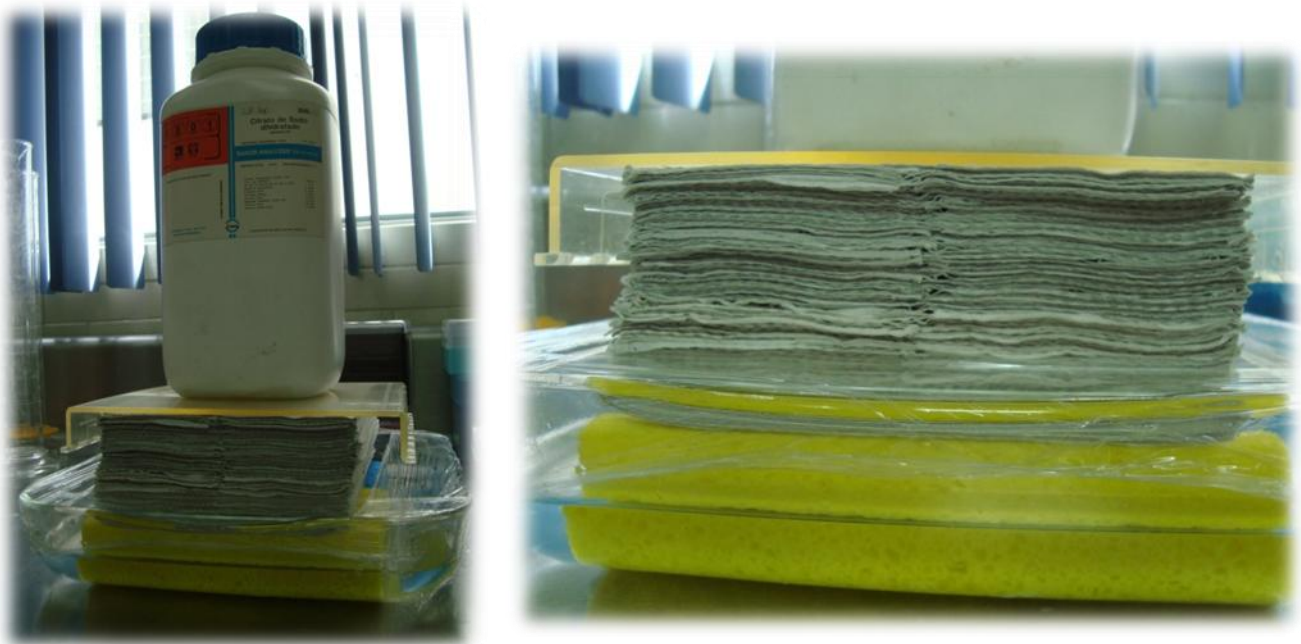
- ✓ Una vez concluida la transferencia, se retiró la membrana de Nylon que se encontraba debajo del gel y se colocó en un recipiente que contenía la solución desnaturalizante (1.5 M NaCl/0.5 N NaOH). Se mantuvo por 10 min. con agitación rotatoria y se retiró de la solución desnaturalizante, escurriéndola y dejándola secar por 10 min.
- ✓ Se fijó el DNA de la membrana, colocando ésta en el equipo Crosslinker UV por 2 min. a 120000  $\mu$ joules.

Para la realización de la transferencia del DNA de la forma clásica por capilaridad, se realizó de la siguiente manera:

4. Depurinación del gel con solución de HCl 2 mM (8.8 mL HCl 12 M; 500 mL H<sub>2</sub>O estéril) con agitación continua y suave (10 rpm por 10 min). Al finalizar, se desechó la solución y se lavó el gel con agua destilada estéril por 10 min.
5. Desnaturalización del gel con solución de NaOH 1.5 M/NaCl 0.5 M [300 mL NaCl 5 M; 20 g NaOH; se completó a 500 mL]. Se mantuvo en agitación continua (10 rpm) por 30 min; se desechó la solución y el gel se lavó con agua destilada estéril por 10 min.
6. Neutralización del gel con solución de Tris 0.5 M pH 7.2/NaCl 1 M [500 mL Tris 1 M pH 7.4; 200 mL NaCl 5 M]. El gel se mantuvo en agitación continua (10 rpm) por 30 min; se desechó la solución y se enjuagó el gel con agua destilada estéril por 10 min. Se dejó escurrir el gel por 3 min.
7. Se montó el sistema de transferencia de la siguiente manera:
  - Se colocó en un recipiente de vidrio, una solución de 10X SSC (NaCl 1.5 M; Citrato de Sodio 0.15 M, pH 7). Al centro del recipiente, se colocó una esponja de 10 x 20 cm para la base del gel, que permitió la transferencia.
  - Sobre la esponja, se colocaron 3 hojas de papel filtro Whatman 3 MM secas, sobre estas, se colocó el gel de agarosa, dirigiendo la parte frontal (los pozos) hacia el papel. Se cortó la esquina superior derecha, como referencia.
  - Sobre el gel, se colocó la membrana de nylon, cargada positivamente, cortada previamente de acuerdo al tamaño del gel y se humedeció previamente en solución neutralizante (**IMPORTANTE:** se **deben** utilizar guantes para que, al realizar el proceso, para evitar contaminar con grasa la membrana, lo que ocasionaría que ésta no se humedecerá

uniformemente). Con ayuda de una pipeta o rodillo, se eliminaron las burbujas que se pudieron formar entre la membrana y el gel.

- Se colocó una hoja de papel Whatman seco sobre la membrana. Una vez completado este montaje, se colocó una pila de toallas secas de papel absorbente, previamente dobladas al tamaño del gel.
- Sobre las toallas se colocó una base recta y, sobre ésta, se colocó un recipiente con peso aproximado de 1 kg, como se muestra en la figura 12. Éste montaje permitió que se llevara a cabo la transferencia del DNA presente en el gel por capilaridad hacia la membrana, y que el paso del amortiguador fuera uniforme. Se dejó la transferencia durante toda la noche.



**FIGURA 12.** Sistema de transferencia con solución amortiguadora SSC 10X. Para evitar la evaporación de la solución de transferencia, se selló el recipiente con plástico autoadherible.

8. Una vez que concluyó la transferencia, se retiraron las toallas de papel, el gel y la membrana del sistema de transferencia. El gel se colocó sobre el

transiluminador UV para observar que no quedara DNA en éste y asegurar que la transferencia fuera completa. El DNA transferido se fijó a la membrana de Nylon, colocándola en el equipo Crosslinker UV por 2 min a 120000  $\mu\text{joules}/\text{cm}^2$ .

### 9.5.6 PRE-HIBRIDACIÓN DE MEMBRANAS

Una vez fijado el DNA en la membrana, se realizó la Pre-hibridación de ésta, empleando la siguiente mezcla: 21 mL de agua bidestilada, 7.5 mL de solución SSPE 20X (Amortiguador de Fosfatos en Solución Salina y EDTA: NaCl 3 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M; EDTA 0.2 M; pH 7.4) y 1.5 mL de SDS 10%. Se colocó la membrana (que se humedeció previamente con solución de trabajo SSPE 20X) en una botella de prehibridación y se adicionaron 15 mL de la mezcla de prehibridación, elaborada previamente, mientras que en otra botella se adicionaron los otros 15 mL restantes de la mezcla y se colocaron en la estufa de hibridación. Se mantuvo en incubación a 37° C por 1 hora, con agitación rotatoria lenta (10 rpm).

### 9.5.7 MARCAJE DEL MARCADOR DE PESOS MOLECULARES POR TÉCNICA *RANDOM PRIMER*

Antes de proceder a la hibridación, se realizó el marcaje radiactivo de la sonda del repetido GAA, (cuya **secuencia** es: 5'-GATTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCA-3') y del marcador de peso molecular DNA Ladder de 1kb:

Se realizó el marcaje con el isotopo radioactivo  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP al marcador de pesos moleculares Ladder DNA Marker® o “escalera” de 1 kb de la marca Axygen® (rango de 300 a 10000 pb), empleando la técnica de Random Primer y de acuerdo a las recomendaciones del kit comercial de *RediPrime*® de la marca GE Healthcare, cuyo fundamento es el siguiente: Este marcaje se basa



en el uso de secuencias de hexanucleótidos al azar que sirven como cebadores para iniciar la síntesis de DNA a partir de una cadena molde de DNA, el cual fue previamente desnaturalizado. El complejo cebador-cadena de DNA es reconocido por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, la cual inicia la síntesis de una nueva cadena, incluyendo dNTP's al mismo tiempo que incorpora la base marcada  $\alpha$ - $P^{32}$ -dCTP (Figura 13A).

El marcaje se realizó de la manera siguiente: Se diluyeron 2  $\mu$ L del marcador de peso molecular en 45  $\mu$ L de buffer TE (Tris-HCl pH 8; EDTA 1 mM) y se desnaturalizó a 95-100° C por 5 min., colocándolo posteriormente en hielo por 5 min.. Posteriormente, se trasvasó al tubo de reacción incluido en el kit comercial y se adicionaron 5  $\mu$ L de  $\alpha$ - $^{32}$ PdCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ L), se mezcló perfectamente y se incubó la reacción por 1 h a 37° C.

Concluido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción adicionando 5  $\mu$ L de EDTA 0.2 M.

#### **9.5.8 MARCAJE DEL EXTREMO 5' DE LA SONDA GAA CON T4-PNK**

Esta mezcla de reacción permite el marcaje del extremo 5' de la secuencia de la sonda que se utiliza como molde. La enzima T4 PNK funciona como catalizador para la transferencia de grupos fosfato del extremo  $\gamma$  del ATP al extremo 5'-OH libre del fragmento de DNA de interés (de doble cadena desnaturalizado), a oligonucleótidos o a nucleósidos 3'-monofosfatos (Figura 13B).

Se realizó el marcaje de la sonda GAA de la siguiente manera: en un tubo de 0.6 mL se adicionaron 14.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 2  $\mu$ L de amortiguador A 10X (Exchange), 2  $\mu$ L de la sonda GAA (10  $\mu$ mol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de enzima T4-PNK de Fermentas® y 1  $\mu$ L de  $^{32}$ P- $\gamma$ dATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ L). Se incubó la mezcla a 37° C por una hora.

Es **IMPORTANTE** que se utilicen las medidas de seguridad indispensables para el manejo y uso del material radiactivo, en este caso, desde el inicio del marcaje hasta el almacenamiento de los productos, los cuales permanecieron dentro de una caja de

acrílico especialmente diseñada para contener material radiactivo, así como en un área especial para su almacenamiento en refrigeración, hasta que fuera utilizado nuevamente, cumpliendo las normas siguientes: **NOM-012-STPS-1999**, Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se produzcan, usen, manejen, almacenen o transporten fuentes abiertas de radiaciones; **NOM-017-STPS-2008** Equipo de protección personal: selección, uso y manejo en los centros de trabajo; **NOM-031-NUCL-2011**, Requisitos para el entrenamiento del personal ocupacionalmente expuesto a radiaciones ionizantes.

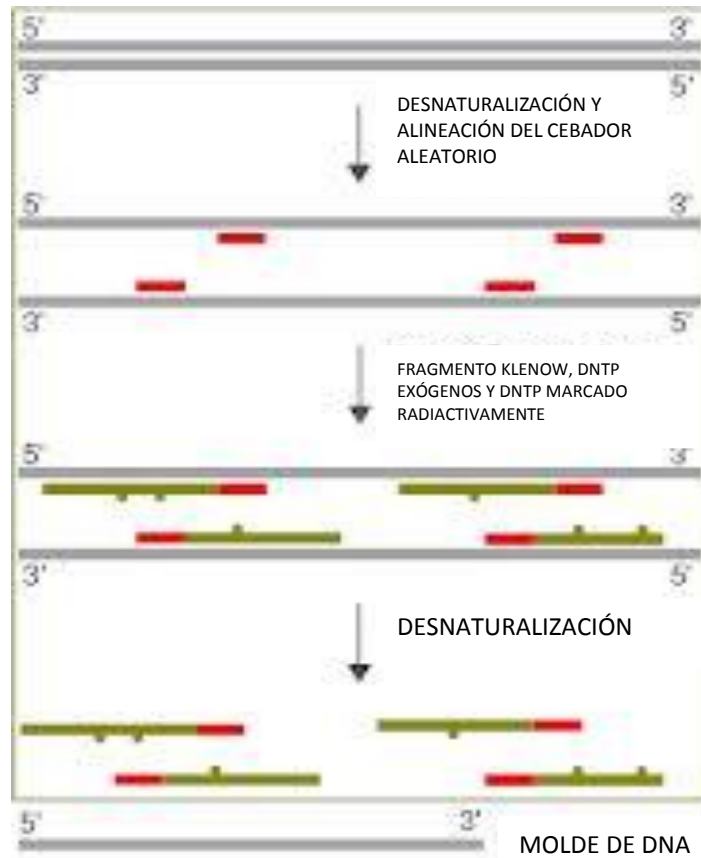


FIGURA A



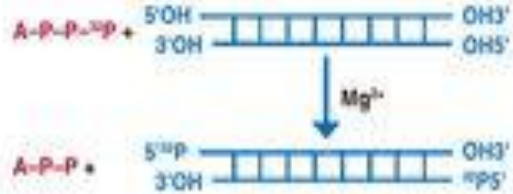
FIGURA B

ACTIVIDAD

REACCIÓN

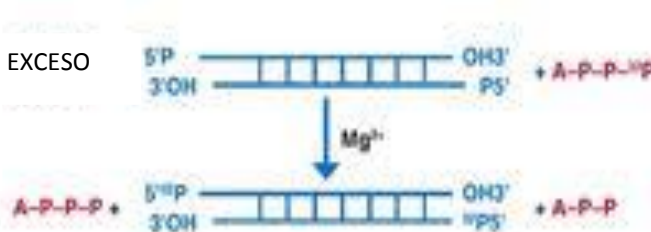
SUSTRATO

1. REACCIÓN  
CINASA DE  
AVANCE



DNA O RNA DE DOBLE  
CADENA O CADENA  
SENCILLA CON  
TERMINACIÓN 5'OH

2. REACCIÓN  
CINASA DE  
INTERCAMBIO



DNA O RNA DE DOBLE  
CADENA O CADENA  
SENCILLA CON  
TERMINACIÓN 5'OH

**FIGURA 13.** Técnicas de marcaje utilizadas para incorporar el material radiactivo al Marcador de pesos moleculares DNA Marker de Axygen® por la técnica Random Primer (A) y a la sonda GAA con enzima T4-PNK (B), utilizados en el procedimiento.

1. Antes de realizar la hibridación, tanto el marcador de peso molecular como la sonda GAA (previamente marcados) se desnaturalizaron a 95-100° C por 5 min. y se colocados en hielo inmediatamente hasta su uso.
2. La hibridación de la membrana con la sonda GAA se realizó de la siguiente manera: se detuvo la rotación de la estufa y se desechó la solución de pre-hibridación de la botella que contenía la membrana. Posteriormente, la solución de hibridación contenida en la otra botella (que se mantuvo en incubación durante la prehibridación) se colocó en la botella que contenía la membrana y, manteniéndola dentro de un contenedor especial de acrílico, se adicionó a la misma botella de hibridación lo siguiente: 9.5  $\mu$ L de sonda GAA marcada y 1  $\mu$ L del marcador de peso molecular. Se hibridó la mezcla a 37° C con agitación rotatoria continua durante toda la noche.
3. Después de la hibridación, se realizó un lavado a la membrana para eliminar el exceso de sonda marcada (previamente se eliminó la solución de hibridación en un recipiente destinado para desechos radiactivos) con 50mL de solución amortiguadora 2X SSPE (previamente incubada a 42° C), se agitó vigorosamente por 2 min. y se desechó el contenido en el recipiente para desechos radiactivos. Esto se realizó colocando el recipiente para desechos y la botella detrás de una mampara de acrílico de 5 mm de espesor, que sirvió como protección
4. Se adicionaron 20 mL de solución SSPE 2X (a 37° C) a la botella de hibridación y se incubó a 37° C por 5 min. Se desechó la solución en el recipiente para desechos radiactivos, y se repitió nuevamente el lavado. Al final de estos lavados, se monitoreó la radiactividad incorporada a la membrana, empleando un detector Geiger.
5. Después de lavar la membrana, ésta se retiró cuidadosamente de la botella de hibridación.

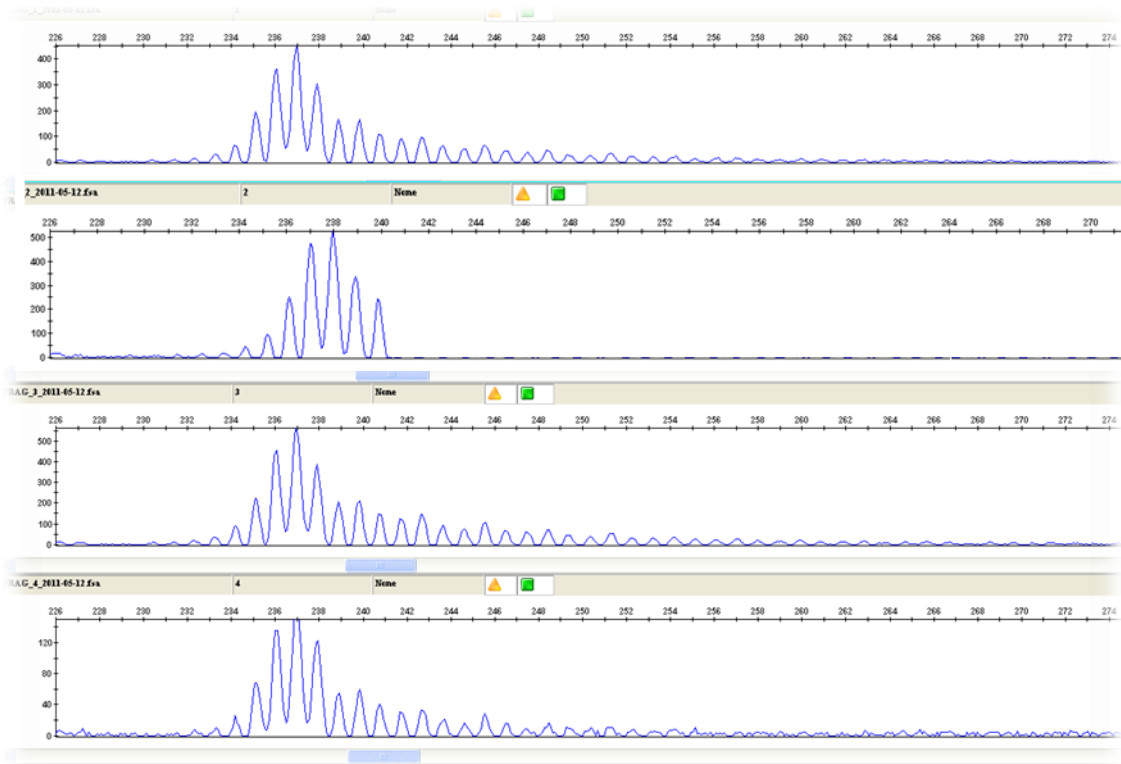
6. Se colocó en un recipiente que contenía solución SSPE 2X (que se incubó previamente a 42° C). Se colocó en agitación orbital (2.5 rpm) por 10 min.

#### **9.5.10 AUTORADIOGRAFÍA**

1. Se desechó la solución de lavado y se dejó secar la membrana, cubriendo el recipiente que la contenía con un protector de acrílico especial. Con ayuda del detector Geiger, se monitoreó la membrana para asegurarse de que no se hubiera eliminado el marcaje y que la hibridación fuera 100%.
2. La membrana se colocó dentro de una bolsa de plástico y se fijó en un cartucho para placas radiográficas Hyperfilm®.
3. En un cuarto oscuro, se colocó una placa radiográfica Kodak® en el cartucho y se verificó que quedara bien cerrado. Se expuso por 1-2 días y, posteriormente, se reveló.

## 10 RESULTADOS

Se realizó un tamizaje rápido mediante el análisis de fragmentos en donde los productos fueron resueltos por electroforesis capilar y con ayuda del software GeneMapper® 4.0, se determinó el tamaño de los alelos y el genotipo, es decir, si las muestras presentaban alelos normales o expandidos, de acuerdo al patrón mostrado en la gráfica (figura 13). La utilización del software GeneMapper® proporcionó algoritmos para reconocer y filtrar artefactos químicos de la amplificación y así el número de picos y sus intensidades son proporcionales a la longitud y el número de repeticiones en el producto de la PCR, además del uso de un marcador de pesos el cual presenta un conjunto de picos de cierto tamaño (de acuerdo al marcador empleado) para diferenciar las repeticiones de microsatélites de diferentes longitudes. Se presentan los diferentes tamaños de los alelos como un patrón continuo que puede descender y presentarse como un tartamudeo en los fragmentos a lo largo de la gráfica y éstos fueron indicativos de una expansión anormal o la presencia de alelos mutados, mientras que, si había un patrón continuo de fragmentos en un solo punto y no continuaba esto indicaba la presencia de alelos con un número de repetidos en el rango normal como se puede observar en la figura 14. Los resultados obtenidos mediante este análisis para cada una de las muestras se resumen en el cuadro 6.



**FIGURA 14.** Se muestran los electroferogramas obtenidos en el Análisis de Fragmentos, por medio del software GeneMapper® 4.0, de los cuales las muestras 1, 3 y 4 son positivas (se muestra el incremento del número de repetidos o la expansión del repetido, en cual se observa como una serie de picos discontinuos, mientras que la muestra 2 presenta una expansión normal, mostrando un patrón de líneas de tamaño similar.

**CUADRO 6.** Resultados obtenidos por el Análisis de Fragmentos de DNA en el secuenciador modelo AB3031 de Applied Biosystems®

Muestra	Presencia de alelos mutados	Resultado obtenido
1	Positivo	Homocigoto
2	Positivo	Homocigoto
3	Positivo	Homocigoto
4	Positivo	Homocigoto
5	Positivo	Homocigoto
6	Positivo	Homocigoto
7	Positivo	Homocigoto
8	Portador	Heterocigoto
9	Positivo	Homocigoto

10	Positivo	Homocigoto
11	Positivo	Homocigoto
12	Portador	Heterocigoto
13	Positivo	Homocigoto
14	Portador	Heterocigoto
15	Portador	Heterocigoto
16	Portador	Heterocigoto
17	Portador	Heterocigoto
18	Positivo	Homocigoto
19	Positivo	Homocigoto
20	Portador	Heterocigoto
21	Portador	Heterocigoto
22	Portador	Heterocigoto

Después de determinar si había o no la presencia de alelos expandidos o mutados, este resultado se confirmó y se determinó el número aproximado de repetidos mediante la hibridación tipo Southern Blot para las muestras positivas. Se estableció que la mejor condición fue realizar el corrimiento electroforético durante toda la noche a 40 v por 16-18 hs y la mejor amplificación para el producto de PCR se dio empleando el kit comercial *Long Range Hot Start KAPA®*. El análisis de las autorradiografías permitió identificar los fragmentos  $\leq 446$  pb para alelos normales y mayores a este tamaño, los cuales corresponden a alelos mutados (mayor a 1000 pb). Estos tamaños se determinaron con ayuda del marcador de peso molecular DNA Marker de Axygen®, y el resultado se dio en pares de bases (pb) para cada una de las muestras. Para estos fragmentos, se determinó su tamaño por interpolación con el marcador de peso molecular y se realizaron los siguientes cálculos para obtener el número de repetidos GAA presentes en el (los) alelo (s) mutado (s):



- I. Se cuentan las bases que no pertenecen al repetido GAA y las bases pertenecientes a los cebadores utilizados (sentido y antisentido).

```

                                     ttgtgtttga agaaactttg ggattggttg
1321 ccagtgctta aaagttagga cctagaaaat ggatttcttg gcaggacgcg gtggctcatg
1381 ccataaatct cagcactttg ggaggcctag gaaggtggat cacctgaggt cggagattca
1441 agactaacct ggccaacatg gtgaaacca gtatctacta aaaaatacaa aaaaaaaaaa
1501 aaaa gaagaa gaagaagaag aa aataaaga aaagttagcc gggcgtggtg tcgcgcgctt
1561 gtaatcccag ctactccaga ggctgcggca ggagaatcgc ttgagcccgg gaggcagagg
1621 ttgcattaag ccaagatcgc ccaatgcact cgggctggg cgacagagca agactccgtc
1681 tcaaaaaata ataataataa ataaaaataa aaaataaaat gga ttcccca gcatctctgg
1741 aaaa ataggc aagtgtggcc atgatgtcc ttagatctcc tctaggaaag cagacattta

```

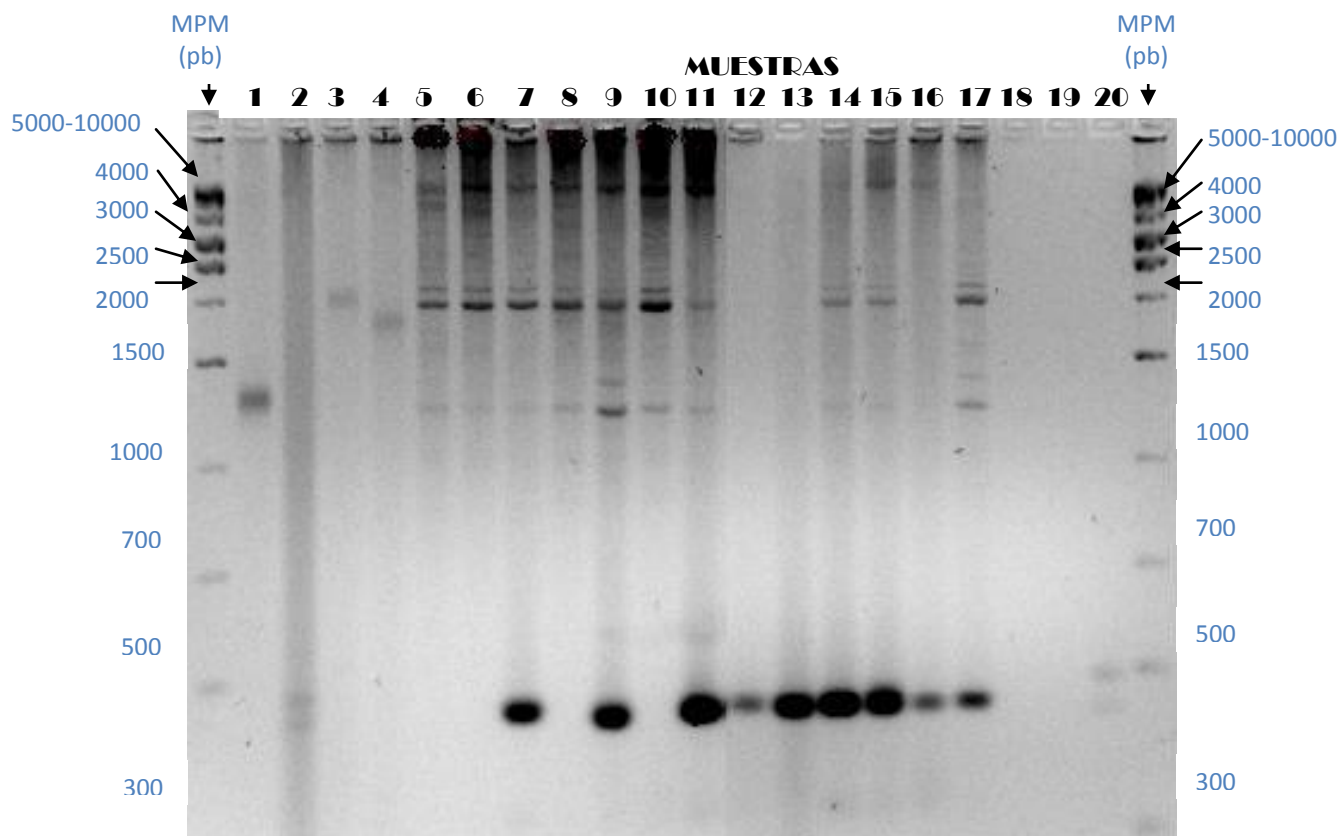
**FIGURA 15.** Fragmento de la secuencia del intrón 1 del gen *FXN*, donde se muestra la posición de los oligonucleótidos empleados y que flanquean la región del repetido GAA, el tamaño varía de acuerdo al número de repetidos presente en cada paciente. La secuencia del oligo F (amarillo), del oligo R (verde) y la ubicación del trinucleótido repetido GAA (rojo)

Antes del repetido: 185 bases + 21 bases oligo F = 206 bases

Después del repetido: 201 bases + 21 bases oligo R = 222 bases

- II. Se restan ambas cantidades al tamaño original del fragmento y el resultado se divide entre 3, pues se trata de un repetido de tres bases (GAA). El resultado es el número de repeticiones del trinucleótido GAA en el alelo.

En la figura 16 se muestra una placa autorradiográfica en donde se confirman los resultados obtenidos en el Análisis de Fragmentos para las muestras estudiadas. En el cuadro 7 se resumen los resultados obtenidos para cada paciente analizado, por la hibridación tipo Southern blot.



**FIGURA 16.** Autorradiografía con muestras analizadas por *Southern Blot*, para FRDA. Se pueden observar las bandas correspondientes al alelo normal de 446 pb para algunas muestras, mientras que en otras se observan bandas de mayor tamaño (1000 pb), que corresponden al (los) alelo (s) mutado (s) con alelos expandidos. En los carriles 1, 3 y 4, se observan las muestras que fueron homocigotas positivas, pues muestran una sola banda mayor a 1000 pb, lo que indica la presencia de alelos mutados; en los carriles 12 y 13 se observan las muestras que fueron homocigotas negativas, pues presentan una sola banda del tamaño esperado (446 pb), es decir, no presentan alelos mutados; en el carril 2 se observa un heterocigoto negativo, pues el tamaño de los alelos es  $\leq 446$  pb, lo que indica la presencia de alelos normales (6-7 repetidos); en el carril 16 se observa un heterocigoto positivo con un alelo mutado (4000 pb) y uno normal (446 pb). En las muestras restantes, se observan bandas inespecíficas, por lo que se repitió el procedimiento de *Southern Blot* para todas ellas.

**CUADRO 7.** Comparación de resultados obtenidos por el Análisis de Fragmentos de DNA en el secuenciador modelo AB3031 de Applied Biosystems® y los obtenidos por la técnica de Southern Blot

Muestra	Fenotipo obtenido Por tamizaje	Número de repetidos GAA por	
		Southern blot	
		Alelo(s) Normal(es)	Alelo(s) Mutado(s)
1	Homocigoto positivo	-----	324/324
2	Homocigoto negativo	17/17	-----
3	Homocigoto positivo	-----	90/90
4	Homocigoto positivo	-----	557/557
5	Homocigoto positivo	-----	491/491
6	Heterocigoto	77	657
7	Homocigoto positivo	-----	224/224
8	Heterocigoto	6	757
9	Homocigoto negativo	17/17	-----
10	Homocigoto positivo	-----	767/767
11	Homocigoto positivo	-----	824/141
12	Heterocigoto negativo	57/6	-----
13	Heterocigoto	54	391
14	Heterocigoto	57/6	-----
15	Heterocigoto	6	291
16	Heterocigoto	6	258
17	Heterocigoto	61	258
18	Homocigoto positivo	-----	524/524
19	Homocigoto positivo	-----	691/691
20	Homocigoto negativo	17/17	-----
21	Homocigoto negativo	17/17	-----
22	Heterocigoto	6	258

## 11 DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se realizó la técnica de análisis de fragmentos empleando el software GeneMapper® 4.0, que permite a los investigadores analizar rápidamente la presencia de alelos normales y mutados, lo cual se considera un tamizaje que nos proporciona información en unas horas y nos permite identificar si el individuo es portador para alelos normales en estado homocigoto, es heterocigoto (ya que presenta un alelo normal y uno mutado) o es portador de ambos alelos mutados en estado homocigoto, representando un gran beneficio en el desarrollo de la investigación clínica. Esta estrategia metodológica, actualmente con el uso de marcadores fluorescentes en un amplio rango de tamaños, puede generar datos de alta calidad en un mínimo de tiempo, así como también permite reducir el costo requerido para un proyecto; sin embargo presenta limitaciones ante la presencia de alelos de gran tamaño o con un número de repetidos alto, que va de 800 a más de 1000 pb y cuando no se cuenta con un secuenciador de DNA, o con controles positivos.

Para realizar la técnica de Southern Blot se requirió de la estandarización de la amplificación de fragmentos largos, por lo que se llevó a cabo a partir de diferentes kits comerciales para realizar la PCR. Estos estuches incluían una polimerasa capaz de amplificar fragmentos de DNA de gran tamaño (de 1 a 3 kilobases), con lo cual se evitó utilizar enzimas de restricción para fragmentar el DNA genómico de la muestra, y así, reducir el tiempo de reacción y la presencia de bandas de productos inespecíficos. Al inicio de las pruebas para la amplificación de los fragmentos deseados, se realizó un gradiente de temperaturas para determinar cuál era la óptima con relación a la temperatura media ( $T_m$ ) a la cual los oligonucleótidos empleados podían unirse a sus secuencias complementarias en el DNA muestra, se determinó también cual era la cantidad óptima de DNA para cada reacción, pues para los demás componentes ya estaban determinadas por el fabricante las cantidades a emplear. Para la amplificación de fragmentos con un gran número de repetidos, se requirió la utilización de una cantidad promedio de DNA de 500 a 800 ng/ $\mu$ L, para que, de esta manera, se pudiera

asegurar que en caso de haber una expansión grande (mayor a 2000 pb), la cantidad del producto amplificado durante la PCR XL fuera el suficiente para que pudiera ser visto después de ser resuelto en el gel de agarosa, sin embargo se pudo observar que a medida de que se incrementa el tamaño de repetido, el producto del fragmento de interés era muy tenue por lo que fue necesario confirmar su presencia empleando la técnica de Southern Blot, así como para descartar en aquellas muestras donde solo se observo un alelo, la presencia de alelos expandidos de mayor tamaño.

Debido a esto, para tener una mejor resolución de los productos amplificados, se requirió que el corrimiento electroforético del gel de agarosa se realizara durante toda la noche (40 v por 16-18 hs) para asegurar una buena separación tanto del marcador de peso molecular empleado como de los fragmentos amplificados en cada muestra. Para la transferencia, de igual manera, se eligió dejar toda la noche para asegurar que todo el DNA que se encontraba en el gel de agarosa pasara por capilaridad a la membrana.

La utilización del equipo iBlot® para este paso tuvo algunas desventajas, pues a pesar de que se reduce el tiempo de transferencia a tan solo unos minutos, así como la utilización de soluciones de trabajo (ya que es una transferencia en donde se aplica una corriente eléctrica), los geles empleados debían ser de un tamaño estándar de acuerdo a el equipo (10 x 15 cm), mientras que otra desventaja es que no eran lo suficientemente gruesos como para contener en sus pozos la totalidad de la muestra de reacción de PCR XL. A pesar de esto, con ambos equipos la transferencia se llevó a cabo completamente.

Para el marcaje radiactivo del marcador de peso molecular y la sonda utilizadas en la hibridación de las membranas, se realizaron pruebas utilizando el kit Rediprime® y la enzima T4 Polinucleótido cinasa (T4PNK) de Fermentas® para ambos, con el fin de determinar con cual se daba un marcaje adecuado. Ambos funcionaron adecuadamente, pero se obtuvo una mejor eficiencia en el marcaje del extremo 5' de

la sonda GAA empleando la enzima T4PNK, mientras que para el marcador de peso molecular, funcionó mejor el marcaje con el kit Rediprime®.

En la parte de la hibridación de la membrana, se debía realizar un lavado final con solución SSPE 2X a 42° C por 10 min., el cual se omitió pues se notó que al realizarlo se perdía en gran parte el marcaje, esto se podía observar después de la autorradiografía (al revelar la placa) por lo que únicamente se realizaron los primeros lavados (el primero con 50 mL de solución 2X SSPE a 37° C por 2 min, y dos más con la misma solución, pero por 5 min a 37° C) y se dejó secar perfectamente la membrana antes de colocarla en el cassette para películas Hyperfilm®.

Los resultados obtenidos de ambas pruebas se muestran en los cuadros 6 y 7, confirmándose los resultados obtenidos por el Análisis de Fragmentos, el cual fue el método utilizado como tamizaje y, de acuerdo a los resultados de cada muestra, se determinó cuales muestras serían analizadas por Southern Blot, no solo para establecer el número de repetidos del trinucleótido GAA, sino además nos permitió confirmar en aquellas muestras en donde solo se mostraba una banda, si éstas eran homocigotas o heterocigotas, tanto para alelos normales como para alelos mutados

El tamaño que correspondía a alelos normales se observó cuando solamente aparecía el fragmento de tamaño aproximado a 446 pb (6 repetidos), con lo cual descartó la presencia de FRDA.

La caracterización molecular de la expansión del repetido que causa FRDA requirió del uso de diferentes protocolos de PCR para poder obtener mejores resultados, los cuales nos permitirían una resolución rápida de la muestra, como fue en el tamizaje y en aquellos casos en donde los productos amplificados podían tener grandes expansiones, las cuales ya no se ven como una banda bien definida en el gel, y que fueron confirmadas por la técnica de Southern Blot. Otra razón por la que se requirió el empleo de la técnica de Southern Blot fue para confirmar que los resultados mostrados en el Análisis de fragmentos eran correctos, dadas las limitaciones del método en cuanto a la resolución del producto o lo que se observó en el gel (previo a la técnica de

Southern Blot) correspondía definitivamente a la presencia de alelos normales y/o mutados.

Se analizaron 22 casos, en los que se confirmó el diagnóstico de la Ataxia de Friedreich o se detectó el estado de portador, los cuales fueron evaluados por el método de análisis de fragmentos empleando un triple cebador en la PCR (TP-PCR). Por este ensayo se identificó en los 22 individuos estudiados expansiones en estado homocigoto en 9 casos, expansiones en estado heterocigoto en 9 casos y 4 casos de no portadores. Los resultados fueron re-evaluados por la técnica de Southern Blot y mostraron 100% de concordancia con los obtenidos por electroforesis capilar. El análisis de fragmentos empleando un triple cebador, nos permitió identificar la presencia de alelos expandidos, aunque sin poder determinar un número exacto del repetido GAA, ya que, como se muestra en los electroferogramas de la figura 14, no se ve como un pico único, sino como una serie de picos discontinuos o "tartamudeos" que van descendiendo. Sin embargo esta estrategia representa una herramienta muy valiosa, pues nos indica la presencia de alelos normales y mutados, empleando poco tiempo y evitando el uso de marcajes radioactivos, esperando que, al mejorar su poder de resolución y ante nuevos estándares de peso molecular, en poco tiempo sustituya a otras técnicas para la detección de mutaciones en pacientes de FRDA y portadores. Mientras tanto la mejor resolución se tiene empleando la transferencia tipo Southern Blot, que a la fecha se considera el método estándar porque nos permitió no solo confirmar lo observado en el tamizaje y darle un valor de certeza, sino también determinar el tamaño aproximado de las repeticiones presentes de alelos normales como de alelos mutados y confirmar la presencia de una banda única o la ausencia de la misma y de esta manera establecer el estado en que se presentaban los alelos en los pacientes analizados. Actualmente se pueden sustituir el empleo de isótopos radioactivos por quimioluminiscencia, sin embargo se requiere de equipo especializado para su análisis.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los pacientes presentaron ambos alelos: normales y mutados. En aquellos que fueron homocigotos para expansiones anormales del trinucleótido repetido GAA, se confirmó el diagnóstico clínico de FRDA y dado su carácter autosómico recesivo, se requiere que ambos alelos estén mutados para que se manifieste la enfermedad. Con todo esto, puede decirse que la hipótesis planteada para el trabajo fue correcta, así como se cumplieron los objetivos establecidos por el proyecto, aunque es necesario realizar un análisis más detallado para descartar la FRDA sobre todo para aquellas muestras cuyo resultado fue de estado heterocigoto es decir, con un alelo que presenta expansión anormal y otro aparentemente “normal”, por lo que, a pesar de que estos casos se presentan en un porcentaje bajo (4%), deben descartarse mutaciones puntuales que se han descrito hasta ahora en el gen *FXN*, y de esta manera asegurar la presencia o no de la enfermedad.

Para las muestras en las que se obtuvo un resultado negativo, pero que el paciente presenta síntomas relacionados a la enfermedad, es importante realizar el análisis molecular para descartar otro tipo de ataxias o bien demostrar que puede deberse a otro tipo de mutaciones hasta la fecha no descritas, pero presentes en los pacientes y que dan lugar a la sintomatología de la enfermedad.

La Ataxia de Friedreich es una enfermedad la cual es aún objeto de estudio de muchos investigadores en el mundo, ya que es importante determinar los mecanismos que conllevan a la deficiencia de la proteína Frataxina y provocan los síntomas que caracterizan a la enfermedad. Hasta la fecha, se han generado muchas hipótesis sobre la posible función de esta proteína en el organismo, estos estudios se han realizado a través de exhaustivos estudios en modelos animales y celulares, esto con el fin de poder introducir blancos terapéuticos que permitan un tratamiento efectivo para esta enfermedad, y así, evitar su evolución antes de que aparezcan las complicaciones que llevan a la muerte temprana de los pacientes.



## 12 CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se logró establecer el diagnóstico molecular de la enfermedad de FRDA, mediante dos estrategias metodológicas, una de ellas basada en el uso de polimerasas para la amplificación de fragmentos largos, empleando triple cebador (o primer) para hacer más eficiente la amplificación y su resolución mediante electroforesis capilar, método por demás rápido e ideal para tamizajes, empleando el Análisis de Fragmentos, por medio del software GeneMapper® 4. El segundo método, la hibridación tipo Southern, nos permitió confirmar los resultados del tamizaje y establecer el número de repetidos presentes en los diferentes alelos, el cual sigue siendo el método estándar empleado en diferentes laboratorios del mundo, ya que resultó ideal para identificar grandes expansiones.

La implementación de estas técnicas en el INNNMVS cubre un fin muy importante: la confirmación del diagnóstico clínico el cual puede ser difícil solo con los hallazgos clínicos, dejando tanto al médico como al paciente con la incertidumbre, por lo que el abordaje y la implementación de nuevas estrategias moleculares que ofrecen la confirmación de diagnósticos ayuda al médico a otorgar un tratamiento adecuado y vislumbrar la velocidad del desarrollo de la sintomatología característica de la enfermedad, para así mejorar la calidad de vida del paciente durante la enfermedad. Estas nuevas estrategias permiten que otros especialistas de la salud, como el genetista, ofrezcan a los pacientes y a sus familiares los riesgos para la descendencia, por lo que un asesoramiento genético oportuno les permitirá tomar la mejor decisión y poder modificar o reafirmar su plan de vida.

### 13 PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, pueden citarse las siguientes propuestas para realizar un estudio más completo sobre la enfermedad:

- Es muy importante realizar una extracción de DNA de la mejor calidad posible por lo que se debe revisar la integridad del DNA obtenido después de una extracción, para asegurar buenos resultados en la amplificación de PCR y se genere la cantidad suficiente de producto.
- Implementar el análisis de las principales mutaciones puntuales reportadas para el gen *FXN*: I154F<sup>33</sup>, G130V (Bidichandani et. al. 1997; Cossée et. al. 1999) , L106S (Bartolo et. al. 1998), D122Y (Cosée et. al. 1999), G139V 465G→A, W155X, 297insT, 118delC y 385-2A→G<sup>32</sup>, con el fin de descartar en las muestras que resultaron heterocigotos para la expansión anormal del trinucleótido GAA, si la sintomatología presentada por el paciente se debe a que presenta un alelo con una mutación puntual y el otro alelo portador de la expansión anormal del trinucleótido GAA.
- Elaborar oportunamente las soluciones de trabajo, así como esterilizarlas para asegurar una buena calidad de éstas al realizar la depurinación, desnaturalización y neutralización del gel, así como la transferencia del DNA a la membrana y su posterior pre-hibridación e hibridación.
- Utilizar un marcador de peso molecular el cual contenga un intervalo grande de fragmentos (aprox. 5 kb o mayor) para poder realizar un mejor análisis del número de repetidos

## 14 REFERENCIAS

1. Schmuker S., Puccio H. 2010. Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press. 19(1): R103-R110
2. Toro G., Yopez S., Palación E. Neurología. 2ª ed. Colombia: El Manual Moderno; 2010
3. Jankovic J., Tolosa E. Enfermedad de Parkinson y Trastornos del Movimiento. 5ª ed. Ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. EEUU, 2007
4. Bradley W., Daroff R. Neurología Clínica. Diagnóstico y tratamiento. 4ª ed. Vol. 1. España: Editorial Elsevier; 2005
5. Tan E-K., Ashizawa T. 2001. Genetic Testing in Spinocerebellar Ataxias. Defining a clinical role. *Arch Neurol*. American Medical Association. 58(2): 191-195
6. Sacca F., Puorro G. et. al. 2011. A Combined Nucleic Acid and Protein Analysis in Friedreich's Ataxia: Implications for Diagnosis, Pathogenesis and Clinical Trial Design. *PLoS ONE*. 6(3): 1-9
7. Jankovic J., Tolosa E. Enfermedad de Parkinson y Trastornos del Movimiento. 5ª ed. EEUU: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2007
8. Gottesfeld J. 2007. Small molecules affecting transcription in Friedreich ataxia. *Pharmacol Ther*. Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, USA. 116(2): 236-248
9. Santos R., Lefevre S. 2010. Friedreich ataxia: Molecular Mecanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc. 13(5): 651-690
10. Puspasari N., Rowley S. et. al. 2011. Long Range Regulation of Human *FXN* Gene Expression. *PLoS ONE*. 6(7): 1-14
11. Wells R. 2008. DNA triplexes and Friedreich ataxia. *The FASEB Journal*. Institute of Biosciences and Tecnology, Texas. 22: 1625-1634
12. Li K., Singh A. et. al. 2010. Expression of Human Frataxin Is Regulated By Transcription Factors SRF and TFAP2. *PLoS ONE*. 5(8): 1-8

13. Kumari D., Usdin K. 2012. Is a Friedreich's Ataxia an Epigenetic Disorder?. *Clinical Epigenetics*. BioMed. 4(2): 1-10
14. Deutch E., Santani A. et. al. 2010. A Rapid, noninvasive Immunoassay for Frataxin: Utility for assessment for Friedreich's Ataxia. *Mol. Genet. Metab.* National Institutes of Health. 101(2-3): 238-245
15. Kim E., Napierela M. 2011. Hiperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of *FXN* transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Researchs*. Oxford University Press. 39(19): 8366-8377
16. Martelli A., Napierala M., Puccio M. 2012. Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's Ataxia through animal and cellular models. *Disease Models & Mechanisms*. 5: 165-176
17. Rasmussen A., Alonso E. et. al. 2006. Clinical heterogeneity of recessive ataxia in Mexican population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 77: 1370-1372
18. Stüwe S., Goetze O. et. al. 2011. Hepatic Mitochondrial dysfunction in Friedreich ataxia. *BMC Neurology*. 11(145):1-4
19. Ye H., Rouault T. 2010. Erythropoiesis and Iron Sulfur Cluster Biogenesis. *Advances in Hematology*. Hindawi Publishing Corporation. 2010: 1-8
20. Stemmler T., Lesuisse E. et. al. 2010. Frataxin and Mitochondrial FeS Cluster Biogenesis. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 285 (35): 26737-23743
21. Payne M. 2011. The Heart in Friedreich's Ataxia: Basic Findings and Clinical Implications. *Prog Pediatr Cardiol*. National Institutes of Health. 31(2): 103-109
22. Ye H., Rouault T. 2010. Human Iron-Sulfur Cluster Assembly, Cellular Iron Homeostasis, and Disease. *Biochemistry*. National Institutes of Health. 2010(49): 4945-4956
23. Tomassini B., Arcuri G. et. al. 2012. Interferon Gamma upregulates frataxina and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press. 21(13): 2855-2861
24. Kumari D., Biacsi R. et. al. 2011. Repeats Expansion affect both Transcription initiation and Elongation in Friedreich ataxia cells. *J Biol*

- Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 286 (6): 4209-4215
25. Schmuker S., Martelli A. 2011. Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Performed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *PLoS ONE* 6(1): 1-12
  26. Mancuso M., Orsucci D. et. al. 2010. Current and emerging treatment options in the management of Friedreich ataxia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. Dovepress. 2010(6): 491-499
  27. Friedman L., Farmer J. et. al. 2010. Measuring the rate of progression in Friedreich ataxia: implications for clinical trial design. *Mov Disord*. National Institutes of Health. 25(4): 426-432
  28. Tomassini B., Arcuri G. et. al. 2012. Interferon Gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press. 21(13): 2855-2861
  29. Mancusso M., Sammarco M. et. al. 2010. Transposon Tn7 Preferentially inserts into GAA-TTC Triplet Repeats under Conditions Conducive to Y·R·Y Triplex Formation. *PLoS ONE* 5(6): 1-8
  30. Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, Brock DJ. 1996. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*, 33:1022–1026
  31. Ciotti P, Di Maria E, Bellone E, Ajmar F, Mandich P. 2004. Triplet repeat primed PCR (TP PCR) in molecular diagnostic testing for Friedreich ataxia. *Mol Diagn*. Nov; 6(4):285-9
  32. De Castro M, et. al. 2000. Genotype and Phenotype analysis of Friedreich's Ataxia compound heterozygous patients. *Hum Genet*; 106:86-92
  33. Campuzano V, Montermini L, Mólto M et al. 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*; 271:1423-1427.