

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA  
CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA REHABILITACIÓN  
DE LAS ATAXIAS HEREDITARIAS  
“CARLOS JUAN FINLAY”

*CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA,  
MOLECULAR Y CLÍNICA DE LA ATAXIA DE  
FRIEDREICH EN CUBA*



Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Médicas

**Dra. Tania Cruz Mariño**

Holguín

2011

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA  
CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA REHABILITACIÓN  
DE LAS ATAXIAS HEREDITARIAS  
“CARLOS JUAN FINLAY”

*CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA,  
MOLECULAR Y CLÍNICA DE LA ATAXIA DE  
FRIEDREICH EN CUBA*

Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Médicas

**Autora:** Dra. Tania Cruz Mariño.

**Tutor:** DrC. Luis Velázquez Pérez.

Profesor Titular.

Investigador Titular.

Holguín

2011

*Que cuando mires dentro de ti, y de lo que haces, te encuentres como la tierra por la mañana, bañada de luz, siéntete limpio y ligero como la luz, deja a otros el mundo frívolo. Tú vales más, sonríe y pasa.*

José Martí.

# **AGRADECIMIENTOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al DrC. Luis Velázquez Pérez, por la oportunidad y el ejemplo.
- A mi esposo, José Luis, por su paciencia infinita.
- A los doctores Patrick MacLeod y Tanya Nelson, por su apoyo invaluable.
- A los colegas del laboratorio: Yanetza, Yaimé, Laffita, Dennis, Danis y Luis Enrique, por sus enseñanzas y su amistad.
- A los compañeros del área clínica: Raúl, Alejandro, Leonides, Anelié, Miguel, Nalia, Jackelin, Roberto, Julio, Yaimara, Arnoy y todos los demás miembros de esa gran familia que es el CIRAH.
- A Ilba, Risi, Gisela, Ondina, Isora, Marcy, Nuria, Sarahí, Jose, Kirenia, Aljimira y Pavón, con quienes comparto la mitad de mis días.
- A todos los que colaboraron en la ejecución de este proyecto.
- A todos mis profesores, con el mayor de los cariños.
- A todos mis amigos, que no necesitan ser nombrados.
- A mis padres, hermanos, tíos, primos y sobrinos, a mi familia por parte de José.

¡Gracias!

# **DEDICATORIA**

## **DEDICATORIA**

A mis queridos pacientes-amigos afectados por ataxia de Friedreich,  
por su valentía y por enseñarme que no tengo derecho a perder las esperanzas.

Especialmente a M, JY, Y, AM, O y JA.

A la memoria de mi abuela Lolita,  
por la sonrisa más dulce que escuché alguna vez.

# **GLOSARIO**

## GLOSARIO DE TÉRMINOS Y DEFINICIONES

**ADN:** ácido desoxiribonucleico.

**AF:** ataxia de Friedreich.

**ANC:** alelos normales cortos.

**ANL:** alelos normales largos.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**CAG:** trinucleótido de bases nitrogenadas Citosina-Adenina-Guanina.

**Centros Fe-S:** centros hierro azufre.

**CIRAH:** Centro para la Investigación y la Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias.

**CpG:** secuencias con un alto porcentaje de dinucleótidos Citosina y Guanina

**dB:** decibeles.

**dNTPs:** trifosfato de deoxinucleósido, del inglés deoxynucleoside triphosphate.

**EDTA:** anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético, del inglés ethylenediamine tetraacetic acid.

**Fe:** hierro.

**FRDA:** gen de la ataxia de Friedreich.

**FRDA2:** segundo locus para un gen que ocasiona ataxia de Friedreich.

**FXN:** proteína Frataxina.

**GAA:** trinucleótido de bases nitrogenadas Guanina-Adenina-Adenina.

**GRD:** ganglio de la raíz dorsal.

**HD:** enfermedad de Huntington, del inglés Huntington disease.

**Heteroalélico:** genotipo conformado por dos alelos diferentes.

**Heterocigótico:** genotipo representado por dos genes que expresan un carácter diferente.

**Homoalélico:** genotipo conformado por dos alelos iguales.

**Homocigótico:** genotipo representado por dos genes que expresan el mismo carácter.

**Hz:** hertzius.

**Kb:** kilobase.

**kHz:** kilohertzius.

**Knockout:** término del idioma inglés que designa un modelo biológico experimental que se obtiene mediante manipulación genómica al bloquearse la expresión de un gen de interés para investigar su función biológica.

**mA:** miliamperes.

**mm:** milímetros.

**mM:** milimolar.

**mmol/L:** milimol por litro.

**mm/s:** milímetros por segundos.

**ms:** milisegundos.

**mV:** milivoltios.

**nm:** nanómetros.

**OH<sup>-</sup>:** radical hidroxil.

**pb:** pares de bases.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polimerase Chain Reaction.

**PEATC:** potenciales evocados auditivos de tallo cerebral.

**PESS:** potenciales evocados somatosensoriales.

**PEV:** potenciales evocados visuales.

**PTG:** prueba de tolerancia oral a la glucosa en dos horas.

**S:** azufre.

**SARA:** escala clínica para la evaluación cuantitativa de la ataxia, del inglés scale for the assessment and rating of ataxia.

**SCA2:** ataxia espinocerebelosa tipo 2.

**SCA3:** ataxia espinocerebelosa tipo 3.

**SCA17:** ataxia espinocerebelosa tipo 17.

**SNC:** sistema nervioso central.

**SOMA:** sistema osteo-mio-articular.

**V:** voltios.

**°C :** grados Celsius.

**μL:** microlitros.

**μM:** micromolar.

**μseg:** microsegundos.

**μV:** microvoltios.

# **SÍNTESIS**

## SÍNTESIS

Se estudiaron 108 enfermos con ataxias recesivas o esporádicas y 277 individuos saludables que vivían en Cuba en el año 2011, con el objetivo de caracterizar el comportamiento epidemiológico, molecular y clínico de la ataxia de Friedreich. Los sujetos afectados fueron evaluados clínicamente y se implementó el análisis molecular del gen FRDA mediante PCR y electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida. La ataxia de Friedreich representa el 0,77% de las ataxias hereditarias, el 18,62% de los casos sin diagnóstico definitivo tiene antecedentes de consanguinidad. La frecuencia de portador resulta 1 en 685 y la prevalencia  $0.053 \times 100\,000$  habitantes. Las manifestaciones neurológicas son similares a las existentes en otras poblaciones, pero la escoliosis es generalmente el signo de presentación y la Diabetes Mellitus no suele asociarse a la enfermedad. Se demostró inestabilidad meiótica y mitótica del gen FRDA en los sujetos afectados, mientras que en la población saludable se evidenció una distribución alélica particular del polimorfismo GAA y una baja frecuencia de alelos normales largos, que indican poca predisposición del gen FRDA a la inestabilidad en la población cubana. El diagnóstico confirmatorio y los estudios predictivos se encuentran ahora a disposición de las familias afectadas.

# ÍNDICE

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
<b>1.1. Antecedentes históricos de las ataxias hereditarias</b> .....	8
<b>1.2. Ataxia de Friedreich (AF)</b> .....	9
<b>1.2.1. Fisiopatología</b> .....	11
<b>1.2.1.1. Gen de la ataxia de Friedreich (FRDA)</b> .....	11
<b>1.2.1.2. Capacidad del ADN de formar estructuras</b> no $\beta$ .....	14
<b>1.2.1.3. Cromatina inactiva</b> .....	14
<b>1.2.1.4. Mecanismo de regulación de la expresión</b> del gen FRDA.....	15
<b>1.2.2. Epigenética. Metilación del gen FRDA y acetilación</b> de histonas.....	15
<b>1.2.3. Inestabilidad meiótica y mitótica del gen FRDA</b> .....	17
<b>1.2.3.1. Inestabilidad meiótica</b> .....	17
<b>1.2.3.2. Inestabilidad mitótica</b> .....	18
<b>1.2.4. Ácido Ribonucleico (ARN)</b> .....	20
<b>1.2.5. Proteína Frataxina (FXN)</b> .....	21

1.2.5.1. Características estructurales de la Frataxina	21
1.2.5.2. Funciones fisiológicas de la Frataxina.....	21
1.2.6. Neuropatología.....	24
1.2.7. Características clínicas de la enfermedad.....	26
1.2.8. Epidemiología.....	28
1.2.9. Estrategias terapéuticas.....	29
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
2.1. Diseño metodológico.....	32
2.2. Sujetos estudiados.....	32
2.2.1. Sujetos afectados por ataxias recesivas o esporádicas.....	32
2.2.2. Sujetos sanos.....	35
2.3. Estudios, técnicas y procedimientos realizados.....	36
2.3.1. Estudio genealógico.....	36
2.3.2. Evaluación clínica.....	36
2.3.2.1. Examen neurológico.....	36
2.3.2.2. Examen neuro-oftalmológico.....	36
2.3.2.3. Examen cardiovascular.....	37
2.3.3. Estudio del metabolismo de la glucosa.....	37
2.3.4. Estudios imagenológicos.....	37
2.3.4.1. Ecocardiograma.....	37
2.3.4.2. Radiografía de columna vertebral.....	38
2.3.4.3. Resonancia Magnética de cráneo.....	38

<b>2.3.5.</b>	Estudios electrofisiológicos.....	39
<b>2.3.5.1.</b>	Electrocardiograma.....	39
<b>2.3.5.2.</b>	Audiometría.....	40
<b>2.3.5.3.</b>	Estudios de conducción nerviosa periférica motora.....	41
<b>2.3.5.4.</b>	Estudios de conducción nerviosa periférica sensitiva.....	41
<b>2.3.5.5.</b>	Potenciales Evocados Multimodales.....	42
<b>2.3.5.5.1.</b>	Potenciales evocados somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior.....	42
<b>2.3.5.5.2.</b>	Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC).....	43
<b>2.3.5.5.3.</b>	Potenciales evocados visuales (PEV).....	43
<b>2.3.6.</b>	Estudio molecular del gen FRDA.....	44
<b>2.3.6.1.</b>	Obtención y conservación de muestras de sangre.....	44
<b>2.3.6.2.</b>	Extracción de ADN genómico.....	44
<b>2.3.6.3.</b>	Determinación de la concentración y pureza del ADN.....	44
<b>2.3.6.4.</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés <u>Polimerase Chain Reaction</u> ).....	45

<b>2.3.6.5.</b> Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	45
<b>2.3.6.6.</b> Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida, análisis de fragmentos de ADN y determinación del número de repeticiones de GAA..	46
<b>2.3.7.</b> Estudio molecular de otros genes con secuencias trinucleotídicas repetitivas de CAG.....	47
<b>2.3.7.1.</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	47
<b>2.3.7.2.</b> Electroforesis de ADN en geles de agarosa	48
<b>2.3.7.3.</b> Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida, análisis de fragmentos de ADN y determinación del número de repeticiones de CAG.	48
<b>2.4.</b> Variables analizadas.....	49
<b>2.4.1.</b> En los sujetos afectados por ataxia de Friedreich....	49
<b>2.4.1.1.</b> Variables genealógicas.....	49
<b>2.4.1.2.</b> Variables epidemiológicas.....	49
<b>2.4.1.3.</b> Variables clínicas.....	49
<b>2.4.1.4.</b> Variable del estudio del metabolismo de la glucosa.....	49
<b>2.4.1.5.</b> Variables de estudios imagenológicos.....	49
<b>2.4.1.5.1.</b> Ecocardiografía.....	49
<b>2.4.1.5.2.</b> Radiografía de columna vertebral	49
<b>2.4.1.5.3.</b> Resonancia Magnética de cráneo	49

<b>2.4.1.6.</b> Variables electrofisiológicas.....	50
<b>2.4.1.6.1.</b> Electrocardiograma.....	50
<b>2.4.1.6.2.</b> Audiometría.....	50
<b>2.4.1.6.3.</b> Estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva.....	50
<b>2.4.1.6.4.</b> Potenciales evocados multimodales.....	50
<b>2.4.1.6.4.1.</b> Potenciales evocados somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior.....	50
<b>2.4.1.6.4.2.</b> Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC).....	50
<b>2.4.1.6.4.3.</b> Potenciales evocados visuales (PEV).....	50
<b>2.4.1.7.</b> Variables de estudios moleculares.....	50
<b>2.4.2.</b> En los sujetos sanos.....	51
<b>2.4.2.1.</b> Variables epidemiológicas.....	51
<b>2.4.2.2.</b> Variables moleculares.....	51
<b>2.5.</b> Variables dependientes e independientes.....	51
<b>2.5.1.</b> Variables dependientes.....	51
<b>2.5.2.</b> Variables independientes.....	51

2.6. Aspectos éticos de la investigación.....	51
2.7. Análisis y procesamiento estadístico de la información.....	52
2.7.1. Cálculo de los indicadores epidemiológicos.....	52
2.7.2. Procesamiento estadístico.....	54
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
3.1. Epidemiología de la ataxia de Friedreich en Cuba.....	55
3.2. Características del gen FRDA en la población normal.....	56
3.3. Características del gen FRDA en sujetos afectados.....	59
3.3.1. Inestabilidad meiótica en la transmisión del gen FRDA.....	60
3.3.1.1. En sujetos afectados por ataxia de Friedreich.....	60
3.3.1.2. En sujetos afectados no-ataxia de Friedreich.....	63
3.3.2. Inestabilidad mitótica del gen FRDA.....	65
3.4. Otros genes con secuencias trinucleotídicas repetitivas de CAG en sujetos con ataxia de Friedreich.....	65
3.5. Características clínicas de la ataxia de Friedreich.....	65
3.5.1. Antecedentes patológicos familiares.....	65
3.5.2. Edad de inicio de la enfermedad.....	66
3.5.3. Tiempo de evolución de la enfermedad.....	67
3.5.4. Síntoma y/o signo de presentación.....	67
3.5.5. Manifestaciones neurológicas.....	67

<b>3.5.5.1. Manifestaciones neurológicas</b>	
cerebelosas.....	67
<b>3.5.5.2. Manifestaciones neurológicas</b>	
no cerebelosas.....	68
<b>3.5.5.3. SARA.....</b>	69
<b>3.5.6. Manifestaciones extraneurológicas.....</b>	69
<b>3.5.6.1. Sistema Osteo-Mio-Articular (SOMA).....</b>	69
<b>3.5.6.2. Aparato cardiovascular.....</b>	69
<b>3.6. Estudio del metabolismo de la glucosa.....</b>	70
<b>3.7. Estudios imagenológicos.....</b>	71
<b>3.7.1. Resonancia Magnética de cráneo.....</b>	71
<b>3.8. Estudios electrofisiológicos.....</b>	71
<b>3.8.1. Audiometría.....</b>	71
<b>3.8.2. Estudios de conducción nerviosa periférica motora</b> <b>y sensitiva de nervios mediano, peroneo profundo y</b> <b>sural.....</b>	71
<b>3.8.3. Potenciales evocados multimodales.....</b>	72
<b>3.8.3.1. Potenciales evocados somatosensoriales</b> <b>(PESS) por estimulación del nervio tibial posterior...</b>	72
<b>3.8.3.2. Potenciales evocados auditivos de tallo</b> <b>cerebral (PEATC).....</b>	72
<b>3.8.3.3. Potenciales evocados visuales (PEV).....</b>	74
<b>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....</b>	76

<b>4.1. Epidemiología de la ataxia de Friedreich en Cuba.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2. Predisposición a la inestabilidad del gen FRDA en la población cubana.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3. Comportamiento del gen FRDA en sujetos afectados.....</b>	<b>84</b>
<b>4.3.1. Inestabilidad meiótica en la transmisión del gen FRDA.....</b>	<b>85</b>
<b>4.3.1.1. En sujetos afectados por ataxia de Friedreich.....</b>	<b>85</b>
<b>4.3.1.2. En sujetos afectados no-ataxia de Friedreich.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3.2. Inestabilidad mitótica del gen FRDA.....</b>	<b>89</b>
<b>4.4. Comportamiento de las repeticiones trinucleotídicas de CAG en los sujetos con AF.....</b>	<b>89</b>
<b>4.5. Características clínicas de la ataxia de Friedreich.....</b>	<b>91</b>
<b>4.5.1. Antecedentes familiares de interés.....</b>	<b>91</b>
<b>4.5.2. Edad de inicio de la enfermedad.....</b>	<b>91</b>
<b>4.5.3. Tiempo de evolución de la enfermedad.....</b>	<b>92</b>
<b>4.5.4. Síntoma y/o signo de presentación.....</b>	<b>93</b>
<b>4.5.5. Manifestaciones neurológicas.....</b>	<b>93</b>
<b>4.5.5.1. Manifestaciones neurológicas cerebelosas.</b>	<b>94</b>
<b>4.5.5.2. Manifestaciones neurológicas no cerebelosas.....</b>	<b>94</b>
<b>4.5.5.3. SARA.....</b>	<b>95</b>

<b>4.5.6.</b> Manifestaciones extraneurológicas.....	96
<b>4.5.6.1.</b> SOMA.....	96
<b>4.5.6.2.</b> Aparato cardiovascular.....	97
<b>4.6.</b> Estudio del metabolismo de la glucosa.....	99
<b>4.7.</b> Estudios imagenológicos.....	100
<b>4.7.1.</b> Resonancia Magnética de cráneo.....	100
<b>4.8.</b> Estudios electrofisiológicos.....	101
<b>4.8.1.</b> Audiometría.....	101
<b>4.8.2.</b> Estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva de nervios mediano, peroneo profundo y sural.....	102
<b>4.8.3.</b> Potenciales evocados multimodales.....	103
<b>4.8.3.1.</b> Potenciales evocados somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior..	103
<b>4.8.3.2.</b> Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC).....	103
<b>4.8.3.3.</b> Potenciales evocados visuales (PEV).....	104
<b>CONCLUSIONES</b> .....	105
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	107
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>ANEXOS</b>	
<b>AUTOBIBLIOGRAFÍA</b>	

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

El término “ataxia” era utilizado desde la época de Hipócrates con el significado literal de desorden o confusión <sup>(1)</sup>. Actualmente, se entiende por ataxia un trastorno de la coordinación de los movimientos, debido a la lesión del cerebelo, sus vías aferentes y/o eferentes, la médula espinal, los nervios periféricos y/o el tallo cerebral <sup>(2)</sup>.

Según su causa, las ataxias se clasifican en hereditarias, adquiridas y esporádicas <sup>(3)</sup>. Las formas hereditarias constituyen un grupo clínico y genéticamente heterogéneo de múltiples afecciones neurodegenerativas que, en su mayoría, se transmiten con patrón de herencia autosómico dominante. Resultan de la expansión de una secuencia trinucleotídica repetitiva de Citosina-Adenina-Guanina (CAG), que es traducida para dar lugar a proteínas con dominios poliglutamínicos expandidos; la ganancia de una nueva función por estas proteínas provoca degeneración de poblaciones neuronales específicas <sup>(4-8)</sup>.

La ataxia de Friedreich (AF) es la más frecuente de las ataxias hereditarias: afecta a 1 en 30 000-50 000 individuos <sup>(9,10)</sup>, con una frecuencia de portador de 1/60 <sup>(11)</sup>; sin embargo, se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo y es la única enfermedad causada por expansiones anormalmente largas de la secuencia repetitiva Guanina-Adenina-Adenina (GAA), que impiden la correcta expresión del gen de la ataxia de Friedreich (FRDA) <sup>(12)</sup>.

Como consecuencia de las dificultades para la transcripción del gen expandido, se producen cantidades insuficientes de la proteína Frataxina (FXN), lo que origina diferentes manifestaciones clínicas, así como edad de comienzo temprano. Las principales características fenotípicas consisten en ataxia progresiva, disartria cerebelosa, dismetría, adiadococinesia, ausencia de reflejos tendinosos en extremidades inferiores, alteraciones del sentido de vibración, escoliosis, Diabetes Mellitus y cardiomiopatía <sup>(11)</sup>.

Los individuos afectados dejan de deambular a los 15 años del comienzo de la enfermedad <sup>(11,13)</sup> y, en la mayoría de los casos, la muerte tiene lugar aproximadamente a la edad de 38 años <sup>(1,13,14)</sup>.

Desde el año 2000 el Centro para la Investigación y la Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias (CIRAH) ha brindado asistencia médica a las familias cubanas afectadas por estas enfermedades y ha desarrollado numerosas investigaciones relacionadas, fundamentalmente, con la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) <sup>(15-27)</sup>, no habiéndose realizado con anterioridad el estudio molecular de las ataxias recesivas o esporádicas.

Como resultado de un estudio epidemiológico nacional desarrollado por el CIRAH, entre los años 2002 y 2004 se evaluaron todos los enfermos afectados por algún tipo de ataxia. De un total de 753 individuos, 666 (88,44%) presentaron una ataxia autosómica dominante, 69 (9,16%) una forma recesiva y 18 (2,39%) fueron casos esporádicos <sup>(28)</sup>.

Entre los años 2004 y 2011, fueron referidos al CIRAH 21 casos esporádicos, diagnosticados en los diferentes servicios de neurología o pediatría del país. La AF

resultaba, por tanto, un diagnóstico posible en los 108 individuos con una ataxia recesiva o esporádica, sin embargo, no se había realizado diagnóstico molecular de certeza a ninguno de ellos.

**Problema Científico:** La ausencia del diagnóstico molecular para la ataxia de Friedreich, en pacientes con ataxias recesivas o esporádicas, no permite la identificación de las características epidemiológicas, moleculares y clínicas en individuos afectados por la misma, ni conocer el comportamiento del gen FRDA en la población normal.

Sin estos elementos no es posible brindar un acertado asesoramiento genético o contar con programas de diagnóstico predictivo presintomático y prenatal.

Al considerar el aspecto relacionado con la política científica, este estudio se inserta en el lineamiento de “Enfermedades Crónicas no Transmisibles” del Ministerio de Salud Pública, en el tema “Enfermedades Genéticas y Discapacitados”.

Es aceptado internacionalmente que la AF resulta la más frecuente de las ataxias hereditarias, se presenta con manifestaciones clínicas clásicas, y uno de cada 60 individuos normales en la población es portador de un alelo expandido para el gen FRDA <sup>(11)</sup>.

A partir de lo anteriormente expuesto se plantea la siguiente **Hipótesis:** deberá encontrarse un marcado predominio de la AF entre las familias cubanas con ataxias recesivas o esporádicas, se identificarán alteraciones clínicas típicas de la enfermedad en los individuos afectados, así como sujetos portadores de la mutación dentro de la población normal.

Con la finalidad de demostrar esta hipótesis se proponen los siguientes **Objetivos:**

**General:**

Caracterizar el comportamiento epidemiológico, molecular y clínico de la ataxia de Friedreich en Cuba durante el año 2011.

**Específicos:**

1. Analizar la prevalencia de la ataxia de Friedreich en Cuba.
2. Caracterizar el polimorfismo GAA del gen de la ataxia de Friedreich en la población normal.
- 3 Describir las características clínicas y moleculares de los individuos afectados por ataxia de Friedreich.

**Novedad Científica:**

- 1) Se implementó el diagnóstico molecular de la AF y se dio inicio al estudio de las ataxias recesivas en Cuba. Esto permitió el establecimiento del diagnóstico confirmatorio de sujetos enfermos y del diagnóstico predictivo de individuos portadores, lo que hizo posible el ofrecimiento de un adecuado asesoramiento genético a las familias y de diagnósticos prenatales como una nueva opción reproductiva para las parejas en riesgo de tener descendencia afectada.
- 2) Es el primer estudio en el país que reporta la prevalencia de la AF y la territorialidad de los casos afectados, así como la frecuencia de sujetos portadores dentro de la población normal.
- 3) Se describen las características clínicas de los individuos enfermos en las que se encuentran variaciones con respecto a los reportes internacionales.

4) Se describe el genotipo de los sujetos saludables para el polimorfismo GAA en el gen FRDA y su correspondencia con la prevalencia de la enfermedad.

El **aporte teórico** de esta investigación está dado por la profundización en el conocimiento del fenotipo clínico de la enfermedad y de las bases genéticas de la AF, lo que enriquece la comprensión de la relación existente entre los alelos normales del gen FRDA y la predisposición poblacional a la enfermedad. Así mismo, la epidemiología de la enfermedad y las características del polimorfismo de GAA en Cuba resultan aportes de interés para la comunidad científica internacional.

El **aporte práctico** consiste en la introducción en el país del diagnóstico molecular confirmatorio de la AF y el comienzo del diagnóstico molecular de portadores en individuos en riesgo.

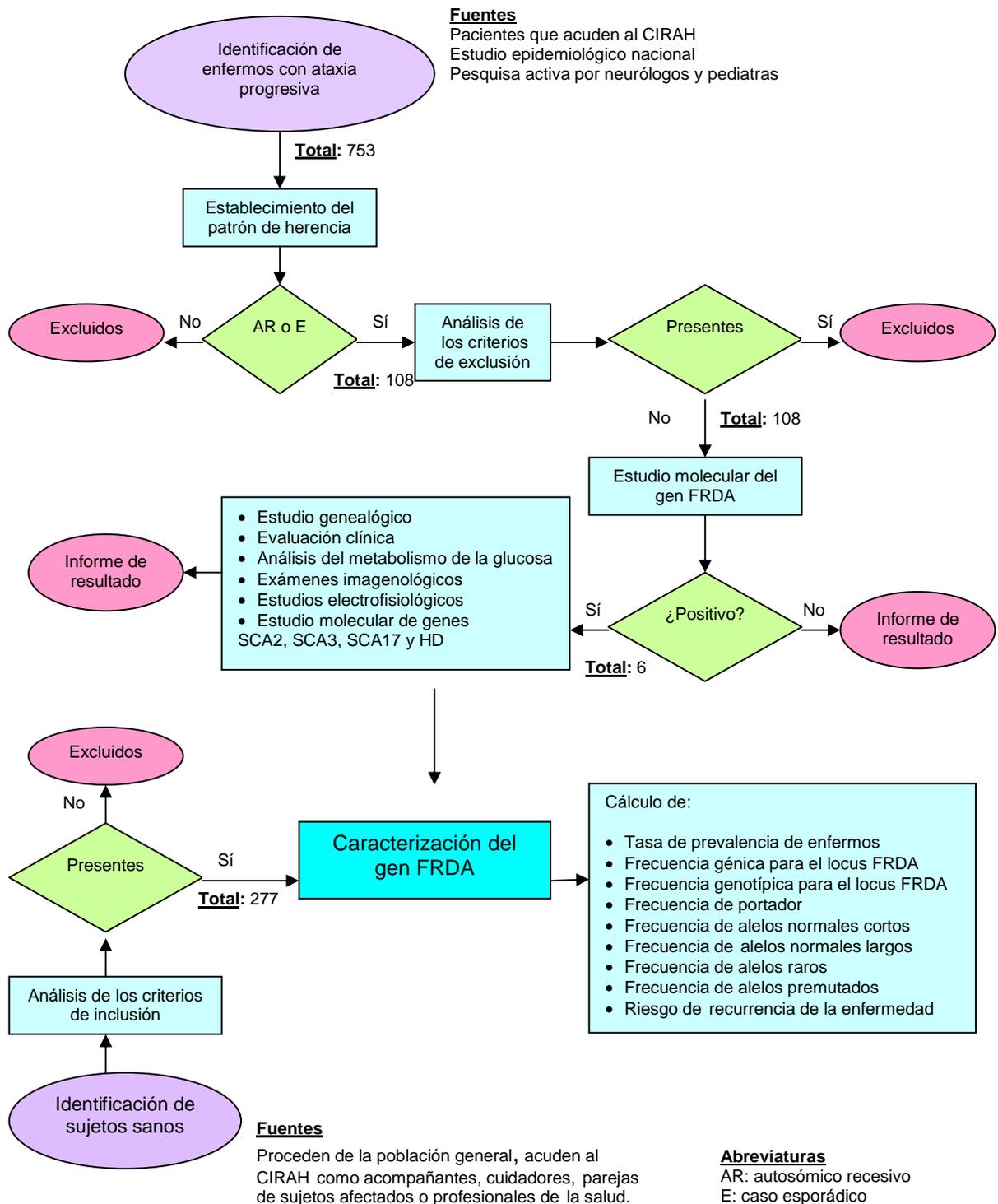
**Fundamento Metodológico:** Se realizó un estudio descriptivo transversal orientado al establecimiento del diagnóstico molecular de la AF y a la caracterización clínica y epidemiológica de la enfermedad en el país.

El polimorfismo de las repeticiones de GAA en el gen FRDA fue analizado en un total de 108 sujetos afectados por ataxias recesivas o esporádicas y en 277 sujetos saludables.

En los individuos con diagnóstico molecular confirmatorio de AF, se realizó estudio genealógico, evaluación clínica, análisis del metabolismo de la glucosa, exámenes imagenológicos, estudios electrofisiológicos y se determinó la longitud de las repeticiones trinucleotídicas de CAG en los genes de las ataxias espinocerebelosas tipo 2, 3, 17 y el gen de la enfermedad de Huntington (SCA2, SCA3, SCA17 y HD).

Teniendo en cuenta las características del gen FRDA, tanto en los sujetos afectados como saludables, se estimaron diferentes indicadores epidemiológicos como tasa de prevalencia de la enfermedad, frecuencia génica y genotípica para el locus FRDA, frecuencia de portador, de alelos normales cortos, normales largos, raros, premutados y riesgo de recurrencia de la enfermedad (Figura 1).

La tesis se estructuró en cuatro capítulos: Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Se presentan además siete secciones: Glosario, Síntesis, Introducción, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas, Anexos y Autobibliografía.



**Figura 1.** Fundamento metodológico empleado para el desarrollo de la investigación.

# **CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Antecedentes históricos de las ataxias hereditarias**

Las primeras observaciones clínicas sobre la marcha atáxica fueron realizadas, según Velázquez <sup>(29)</sup>, por Galen en 1821, quien consideró como causas desencadenantes el efecto de la embriaguez alcohólica y la senilidad, incluyendo posteriormente a la sífilis.

A comienzos del siglo XIX, Duchenne utilizó el término “ataxia locomotora” para denominar a la Tabes Dorsal. Friedreich, en 1863, fue el primer autor en describir pacientes con una forma hereditaria de ataxia autosómica recesiva que se diferenciaba de la “ataxia locomotora”. En 1893, Pierre Marie llamó la atención sobre un grupo de familias, reportadas en la literatura, que sufrían de una forma de ataxia hereditaria clínicamente distinta de la reportada por Friedreich, usualmente con herencia autosómica dominante <sup>(1)</sup>.

Desde entonces, numerosos tipos de ataxias han sido descritas en la literatura. Harding <sup>(1)</sup> considera que no es exagerado plantear la existencia de tantas clasificaciones como autores han trabajado en el tema.

A finales del siglo XX, se produjeron avances notables en la genética molecular que permitieron la identificación de los genes responsables de varias de estas condiciones. Otro grupo mayor de genes son de reciente descubrimiento, o aún

desconocidos <sup>(30-38)</sup>. Las investigaciones conducidas por La Spada y Verkerk, en 1991, evidenciaron que las expansiones de trinucleótidos repetidos en tándem constituían un nuevo mecanismo de producción de enfermedades hereditarias <sup>(39,40)</sup>.

A partir de estos resultados fueron clasificadas en dos grupos:

a) Enfermedades producidas por repeticiones trinucleotídicas de CAG en las regiones codificadoras de los genes, que al ser traducidas dan lugar a proteínas con dominios poliglutamínicos expandidos (enfermedades poliglutamínicas). En este grupo se encuentran las ataxias espinocerebelosas tipo 1, 2, 3, 6, 7, 17, la enfermedad de Huntington, la Atrofia Muscular Espinobulbar y la Atrofia Dentatorubral-pálidoluysiana.

b) Enfermedades producidas por expansiones en secuencias trinucleotídicas o pentanucleotídicas repetitivas localizadas en regiones no codificadoras de los genes. Se trata de la AF (GAA), el Síndrome de Frágil-X (GGC y GCC), la Distrofia Miotónica (CTG), además de las ataxias espinocerebelosas tipo 8 (CTG), tipo 10 (ATTCT) y tipo 12 (CAG).

## **1.2. Ataxia de Friedreich (AF)**

Nicholaus Friedreich comenzó sus observaciones sobre la ataxia en 1850, al darse cuenta de que los pacientes sufrían de una entidad diferente a la ataxia locomotora descrita por Duchenne. Presentó sus datos por primera vez en una reunión en Speyer, Alemania, en 1861 y realizó varias publicaciones.

En la primera publicación describió nueve pacientes pertenecientes a tres familias, que se diferenciaban de la Tabes Dorsal por: la ocurrencia hereditaria, la edad temprana de comienzo, la larga duración de la enfermedad, el hecho de que siete de

los nueve pacientes eran del sexo femenino y la ausencia de pérdida sensorial al menos en los estadios iniciales.

La enfermedad comenzaba con ataxia, al inicio sólo en las piernas y después en los brazos; luego aparecía disartria, en ocasiones acompañada por nistagmo; escoliosis y deformidad de los pies. La pérdida sensorial en las piernas ocurría después de muchos años de evolución, y la pérdida de sensación articular sólo estaba presente en un paciente al que le resultaba difícil caminar en la oscuridad, o con los ojos cerrados <sup>(41)</sup>.

Mediante la autopsia de cuatro pacientes demostró la degeneración de las columnas de la médula dorsal, particularmente, en la parte inferior. Por examen microscópico notó atrofia de los nervios y desmielinización, así como reemplazo por tejido fibrilar fino. De manera interesante, concluyó el artículo mencionando una marcada degeneración grasa del músculo cardíaco que asoció con una tendencia aumentada de los pacientes al colapso <sup>(41)</sup>. En 1875, Erb, el discípulo de Friedreich, describió la ausencia de reflejos tendinosos profundos en estos pacientes <sup>(42)</sup>.

La comunidad neurológica se negó a aceptarla como una nueva enfermedad considerándola una variante de la Tabes Dorsal y la Esclerosis Múltiple, hasta que Charcot, en 1884, dos años después de la muerte de Friedreich, describió un paciente con ataxia hereditaria no Tabes-no Esclerosis Múltiple. A partir de entonces, muchos pacientes afectados por una ataxia cerebelosa con patrón dominante fueron erróneamente diagnosticados como AF, hasta que Anita Harding introdujo el patrón de herencia autosómica recesiva como un criterio diagnóstico mayor <sup>(1)</sup>.

Hoy se reconoce que, en el año 1800, Gowers presentó tres casos de AF ante la Sociedad Clínica de Londres, y mencionó que dos casos similares habían sido mostrados a la sociedad nueve años antes por Carpenter, de manera que el primer reporte de la enfermedad data, verdaderamente, del año 1791 <sup>(1)</sup>.

### **1.2.1. Fisiopatología**

La AF es una enfermedad autosómica recesiva ocasionada por una mutación homocigótica en el gen FRDA. Se trata del aumento en el número de repeticiones del trinucleótido GAA ubicado en el intrón 1 del gen, lo que trae como consecuencia dificultades en la transcripción con disminución del Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm) y, por consiguiente, disminución en la producción de la proteína FXN <sup>(12)</sup>.

La pérdida de función de la proteína ocasiona alteraciones en el metabolismo del hierro (Fe) y de los centros hierro-azufre (Fe-S), así como daño oxidativo, todo lo cual tiene una repercusión sistémica que está relacionada con las manifestaciones clínicas de la enfermedad <sup>(43)</sup>.

#### **1.2.1.1. Gen de la ataxia de Friedreich (FRDA)**

Mediante estudios de ligamiento genético e hibridación *in situ*, fue posible determinar que el locus del gen FRDA estaba localizado en 9q13-q21.1 <sup>(44)</sup>. En 1997, Kostrzewa ofreció evidencias de un segundo locus para la AF ubicado en 9p, al que denominó FRDA2. Con esto demostró que las dos formas genéticamente diferentes de AF resultan clínicamente indistinguibles <sup>(45)</sup>.

El gen FRDA se extiende a lo largo de 80 kilobases (Kb) y consta de siete exones, de los cuales los cinco primeros codifican para una proteína llamada FXN. El gen se

expresa en todas las células, pero en niveles variables, lo que en cierta medida se relaciona con el contenido mitocondrial de las mismas <sup>(11)</sup>.

En 1996, Campuzano realizó la identificación y descripción de un microsatélite (la repetición del trinucleótido GAA) en el intrón 1 del gen FRDA como responsable de la enfermedad <sup>(46)</sup>. Los microsatélites constituyen aproximadamente el 3% del genoma humano, son repeticiones en tándem de 1-6 nucleótidos altamente conservados, que interaccionan entre sí regulando el desarrollo y funcionamiento cerebral y generando diversidad genómica y funcional <sup>(47,48, 49)</sup>.

Las repeticiones GAA-TTC son de las más ubicuas, pueden encontrarse con longitudes variables en todos los cromosomas y con frecuencia constituyen los trectos de repeticiones más largos en el genoma<sup>(49)</sup>.

El desequilibrio de ligamiento existente entre el locus FRDA y marcadores vecinos sugiere dos hipótesis: una única o pocas mutaciones ancestrales dieron lugar a la repetición trinucleotídica asociada con el gen FRDA o existen expansiones recurrentes en un reservorio poblacional de alelos de riesgo, la generación de las cuales representa el evento fundador o premutación <sup>(50)</sup>.

Esta segunda hipótesis está justificada por el hallazgo de dos clases de alelos normales: alelos normales cortos (ANC) y alelos normales largos (ANL). Las mutaciones y premutaciones se originan de un pequeño grupo de ANL de 13-33 repeticiones, todos los ANL pueden haber evolucionado de un evento único que transformó un ANC (de 6 a 12 repeticiones) en un ANL. Los ANL constituyen un reservorio para expansiones accidentales y reemplazan a aquellas que desaparecen a causa de la ventaja reproductiva disminuida de los individuos con AF <sup>(50)</sup>.

La distribución de frecuencia de los alelos normales (ANC y ANL) del gen FRDA es particular en cada población, y no existen reportes previos de la misma en la población cubana.

Los alelos con más de 27 repeticiones de GAA se consideran alelos raros, y los que contienen de 34 a 65 repeticiones se denominan alelos premutados. Estos últimos contienen, con frecuencia, interrupciones de GAG,  $(GAGGAA)_n$ , que les confieren cierto grado de estabilidad <sup>(51,52)</sup>.

La expansión homocigótica del trinucleótido GAA por encima de 66 repeticiones, es responsable del 98% de los casos de AF, el 2% restante se produce en heterocigotos compuestos por una expansión trinucleotídica de GAA y una mutación puntual.

Las mutaciones puntuales pueden alterar la secuencia codificadora de la FXN y dar lugar a una proteína no funcional o ausente; algunas son mutaciones truncantes que siempre afectan la mitad carboxi-terminal de la proteína, otras generan un cambio en la secuencia de aminoácidos envuelta en su plegamiento, o en regiones conservadas, relacionadas con las interacciones proteína-proteína o la unión al Fe <sup>(53,54)</sup>.

También pueden existir mutaciones sin sentido o en el sitio de empalme, raramente se han descrito deleciones o microdeleciones. En el Anexo 1 se muestran las variantes de secuencias patogénicas conocidas, no se han identificado enfermos con dos mutaciones puntuales sin expansión del trinucleótido GAA <sup>(11,53)</sup>.

Las expansiones trinucleotídicas ocasionan la pérdida de actividad transcripcional del gen FRDA, con deficiencia en los niveles de ARNm de la FXN. Se proponen dos modelos para explicar el silenciamiento génico <sup>(55)</sup>:

- 1) La inhibición de la transcripción es causada por una estructura inusual del Ácido Desoxiribonucleico (ADN) adoptada por las repeticiones GAA-TTC.
- 2) Las repeticiones GAA-TTC, que semejan al ADN satélite silente transcripcionalmente, reclutan las proteínas de unión a la heterocromatina y ocasionan silenciamiento génico a través de una estructura cromatínica inactiva.

#### **1.2.1.2. Capacidad del ADN de formar estructuras no $\beta$**

El tracto de ADN en el cual se encuentra el trinucleótido GAA sólo contiene purinas (R) en una cadena, y pirimidinas (Y) en la otra; las secuencias R-Y pueden adoptar estructuras no  $\beta$  de tres cadenas <sup>(56,57)</sup>.

Las repeticiones de GAA expandidas pueden plegarse sobre sí mismas y formar triples intramoleculares R-R-Y, en los que dos cadenas R y una Y se asocian dejando un segmento de cadena Y no apareado <sup>(58)</sup>. Dos regiones de triples R-R-Y en la misma, o en diferentes moléculas de ADN, pueden formar un nuevo tipo de estructura del ADN al unirse a través del intercambio de la tercera cadena R. Esta estructura se denomina ADN pegajoso y es capaz de inhibir la transcripción <sup>(11)</sup>.

#### **1.2.1.3. Cromatina inactiva**

El ADN se envuelve alrededor de las histonas creando los nucleosomas en la cromatina. Las repeticiones excesivas de ADN producen un "empaquetamiento" de regiones genómicas más denso que en el ADN codificador, y constituyen estructuras de heterocromatina inaccesibles, implicadas en el silenciamiento génico mediante represión de la transcripción <sup>(54,59,60)</sup>.

Si un gen es anormalmente repetitivo y compuesto por ADN no codificante, se apaga en algunas células, pero en otras no y el empaquetamiento se puede extender a los

genes cercanos apagándolos o guardándolos silentes. Esto se denomina variación por efecto de posición <sup>(61)</sup>.

#### **1.2.1.4. Mecanismo de regulación de la expresión del gen FRDA**

El locus FRDA salvaje está en un ambiente de cromatina abierto, permite la transcripción activa del gen por lo que existe expresión de FXN en todas las células. Cuando en el locus FRDA se produce una repetición de GAA expandida, esta puede hacer que la cromatina se cierre (nucleosomas empaquetados apretadamente) formando la heterocromatina.

La cromatina en el promotor también puede cerrarse debido a su proximidad a la heterocromatina en el intrón 1 (mediante variación por efecto de posición), por ello la FXN sólo puede expresarse en una proporción de células.

Los cambios de la cromatina producidos por repeticiones, también pueden afectar el inicio de la transcripción al bloquear la unión al promotor de factores regulatorios importantes que potencian la transcripción (como SRF y TFAP2) con desregulación de la expresión de la FXN en todas las células.

La transcripción también puede resultar impedida mediante afectación de la elongación por la polimerasa II del ácido ribonucleico (ARN polimerasa II), por lo que la expansión del trinucleótido GAA es capaz de reducir tanto el inicio como la elongación de la transcripción <sup>(43,62-64)</sup>.

#### **1.2.2. Epigenética. Metilación del gen FRDA y acetilación de histonas**

El primer intrón de muchos genes contiene secuencias regulatorias importantes para la expresión génica. El intrón 1 del gen FRDA contribuye a la actividad promotora del gen, su extremo 5' (que se encuentra inmediatamente por delante de la repetición de

GAA) contiene secuencias con un alto porcentaje de dinucleótidos Citosina y Guanina (CpG) metilables <sup>(65)</sup>.

Existe correlación directa entre el tamaño de la expansión de GAA y la metilación de CpG, lo cual representa el posible vínculo con el silenciamiento transcripcional del gen FRDA <sup>(65)</sup>. La metilación está limitada a la región adyacente a las repeticiones, ocurre en un número variable de residuos CpG en líneas celulares de sujetos sanos y enfermos, pero resulta más extensa (50% más alta) en los individuos con AF.

Tres residuos, el 3, 6 y 13, se encuentran libres de metilación en individuos no afectados, pero casi siempre metilados (75-100%) en individuos con AF, la metilación de estos residuos puede interrumpir la unión de factores de transcripción y llevar a reducción en la expresión de la FXN <sup>(66)</sup>.

Existe correlación inversa entre el estado de metilación y la edad de comienzo de la enfermedad. Los sujetos con mayor grado de metilación en los sitios CpG específicos del gen expandido, desarrollan la enfermedad más tempranamente. La metilación es responsable del 30% de la variabilidad en la edad de comienzo, además de la contribución del fondo genético y de los factores ambientales <sup>(66)</sup>.

El aumento de metilación de residuos específicos del ADN, parece ser una consecuencia secundaria de la disminución de la acetilación de las histonas como H3K14, H4K5, H4K8 y H4K12 <sup>(11,13,66)</sup>. El enriquecimiento de la heterocromatina con histonas hipoacetiladas, incrementa la accesibilidad a otras proteínas remodeladoras de la cromatina, lo que resulta en una estructura heterocromatínica y/o promueve la formación de triples GAA-GAA-TTC <sup>(61)</sup>.

También se han observado niveles elevados de histona 3 dimetilada y trimetilada en lisina 9 (H3K9) en células AF, consistentes con una organización de la cromatina más represiva <sup>(66)</sup>.

### **1.2.3. Inestabilidad meiótica y mitótica del gen FRDA**

#### **1.2.3.1. Inestabilidad meiótica**

La inestabilidad meiótica es el cambio que se produce en el segmento genómico de un gen dado, como las repeticiones trinucleotídicas, durante el proceso molecular de transmisión de la herencia, así pueden producirse expansiones o contracciones del número de determinados nucleótidos <sup>(49,67)</sup>.

No existe estimado preciso acerca del riesgo de que un alelo intermedio pase a expandido, pero diferentes factores se asocian con el aumento de riesgo de inestabilidad repetitiva, entre ellos:

- Sexo del progenitor: podría deberse a aspectos del desarrollo germinal, como las numerosas divisiones mitóticas en el desarrollo del espermatozoide, o los eventos meióticos en la producción de ovocitos.
- Secuencia: el espermatozoide de individuos con AF tiene tendencia natural a las contracciones *in vivo*, mientras que el espermatozoide de individuos afectados por Distrofia Miotónica tipo 1 tiende a las expansiones, lo que sugiere una contribución de la variabilidad genética en las secuencias flanqueantes.
- Pureza de la repetición: cuando la repetición de GAA es pura, se expande más en las transmisiones que cuando tiene igual tamaño pero está interrumpida.
- Haplotipo del gen: varios haplotipos están más frecuentemente asociados con las expansiones y con los ANL en la AF. La frecuencia de ANL se relaciona con la

prevalencia de la enfermedad, y sugiere la existencia de un haplotipo predisponente como reservorio para expansiones mayores.

-Tamaño de la repetición: las nuevas mutaciones generalmente surgen de alelos intermedios y no de alelos normales. Los alelos intermedios tienen más estabilidad intergeneracional que los alelos expandidos, pero más inestabilidad que los alelos normales, a la vez, necesitan expansiones menores que los normales para alcanzar el umbral de la enfermedad.

-Polaridad: la inestabilidad ocurre en uno de los lados del tracto repetitivo, lo que sugiere un efecto de polaridad <sup>(54,68-73)</sup>.

Los alelos normales (ANC y ANL) muestran tendencia a transmitirse de manera estable de padres a hijos, en particular, cuando están interrumpidos por secuencias (GAGGAA)<sub>n</sub> que les confieren mayor estabilidad. Por el contrario, los alelos expandidos presentan inestabilidad intergeneracional, y presentan contracciones en las transmisiones paternas con una probabilidad del 20-30%, e igual tendencia a expansiones y contracciones en las transmisiones maternas <sup>(68)</sup>.

Los alelos de 34 a 65 repeticiones de GAA se denominan premutados porque pueden hiperexpandirse cientos de veces, tanto en transmisiones maternas como paternas, originando alelos expandidos en la descendencia, especialmente cuando no están interrumpidos por el trinucleótido GAG <sup>(46,50,52)</sup>.

### **1.2.3.2. Inestabilidad mitótica**

Al nacimiento, todas las células en el organismo presentan el tamaño de los alelos del gen FRDA heredados, estos alelos no tienen implicaciones tóxicas. Durante la vida del individuo el número de repeticiones de GAA aumenta independiente y

aleatoriamente, hasta sobrepasar el umbral específico de normalidad en un número suficiente de células, como el ganglio de la raíz dorsal (GRD) y el cerebelo, momento en que comienzan las manifestaciones clínicas. La enfermedad progresa a medida que un mayor número de células resultan afectadas <sup>(74)</sup>.

El mecanismo de expansión somática es largo-dependiente, pues la longitud de las repeticiones determina la edad de comienzo de la inestabilidad somática, así como el rango y la magnitud de la mutación. Los alelos más largos se expanden más tempranamente, ya que no sólo se heredan con un número de repeticiones más próximo al umbral, sino que comienzan su inestabilidad con un rango mayor de expansiones.

La edad de comienzo en la AF depende de la longitud del alelo más corto o de ambos alelos pues, tratándose de una enfermedad recesiva, la célula resulta afectada sólo cuando el alelo más corto también ha sobrepasado el umbral <sup>(74)</sup>.

La neurodegeneración primaria selectiva del GRD explica el origen de la ataxia, pero no la naturaleza progresiva de la enfermedad, que se debe a la acumulación edad dependiente y tejido específica de expansiones largas de GAA. La hipótesis de inestabilidad somática edad dependiente y tejido específica, también se considera como un determinante de la afectación progresiva del cerebelo <sup>(75)</sup>.

Los alelos FRDA expandidos con más de 500 repeticiones muestran sesgo marcado de contracción. En las células somáticas, en la sangre periférica y en el esperma, los tramos de repeticiones expandidas pueden, incluso, revertirse al rango normal. Por el contrario, los segmentos expandidos cortos de menos de 500 repeticiones muestran sesgo de expansión <sup>(57,68,75)</sup>.

Las repeticiones GAA-TTC puras mayores de 44 repeticiones encontradas en otros puntos del genoma humano y de ratón, son menos inestables que las del gen FRDA, sugiriendo que la inestabilidad somática es regulada por factores locus-específicos <sup>(68)</sup>.

#### **1.2.4. Ácido Ribonucleico (ARN)**

El transcripto de ARNm principal tiene 1,3 Kb y se origina a partir de cinco exones enumerados del 1 al 5a. Otro transcripto que se produce en menor proporción incluye al exón 5b y tiene significación funcional desconocida <sup>(11)</sup>.

El ARNm de FXN se encuentra más abundantemente en corazón, hígado, músculo esquelético y páncreas. En el Sistema Nervioso Central (SNC) la expresión es mayor en médula espinal, con niveles menores en cerebelo y muy baja expresión en corteza cerebral.

Los sujetos enfermos tienen niveles residuales de ARNm del 13% al 30% y los portadores del 40% en relación con los controles, por lo que se aprecia correlación inversa entre las repeticiones de GAA y los niveles de ARNm <sup>(76)</sup>.

La disminución significativa de los niveles de ARNm debida al bloqueo de la elongación de la transcripción, se produce mediante demora de la ARN polimerasa II dentro de la secuencia (GAA)<sub>n</sub> expandida, o a través de la formación de estructuras triples, pues los trinucleótidos GAA transcritos nacientes podrían formar un ARN pegajoso que interferiría con el procesamiento intrónico normal del pre-ARNm <sup>(43)</sup>.

Una explicación alternativa podría ser la alteración en el empalme del ARN, su procesamiento o estabilidad, ya que las repeticiones de GAA se unen a diferentes factores de empalme y pueden dar lugar a un empalme aberrante o a reducción de la

eficiencia del empalme, con la acumulación de un pre-ARNm intermediario que no se convierte en ARNm maduro <sup>(77)</sup>.

## **1.2.5. Proteína Frataxina (FXN)**

### **1.2.5.1. Características estructurales de la Frataxina**

El ARNm de la FXN es traducido a un precursor polipeptídico y transportado a la matriz mitocondrial, donde se elimina la secuencia de tránsito para producir la proteína madura, que se localiza en la membrana mitocondrial interna <sup>(78)</sup>.

Existen al menos dos formas con diferentes propiedades bioquímicas, la forma monomérica FXN(81-210) dona Fe(2+) para el ensamblaje de los centros hierro azufre (centros Fe-S), mientras que la forma oligomérica FXN(42-210) dona lo mismo Fe(2+) que Fe(3+). Ambas isoformas son capaces de asegurar el incremento en la síntesis de los centros Fe-S, y están presentes en líneas celulares controles de manera estable, estando más depletada la primera en muestras de sujetos con AF <sup>(79)</sup>.

El plegamiento de la FXN consiste en una región N-terminal sólo presente en eucariotas y un dominio globular C-terminal, altamente conservado desde bacterias hasta humanos, que corresponde a los exones 3, 4 y 5a. Todas las mutaciones con pérdida de sentido en sujetos heterocigotos afectan residuos conservados <sup>(78)</sup>.

### **1.2.5.2. Funciones fisiológicas de la Frataxina**

Las importantes funciones de la FXN en su estado normal sólo son entendidas parcialmente, pero los organismos deficientes (desde la levadura unicelular hasta los humanos) exhiben diversos trastornos metabólicos <sup>(43,80,81)</sup>:

*Metabolismo del Fe.* La FXN se une al Fe de manera directa. Si los niveles de la proteína disminuyen, el Fe se acumula en las mitocondrias, con reducción en su utilización y liberación, lo que conduce a la sobrecarga mitocondrial de Fe <sup>(82)</sup>.

Existe una relación entre la falta de FXN y el déficit de los centros Fe-S. Los centros Fe-S son complejos de átomos de Fe y de azufre (S) utilizados por una serie de enzimas localizadas en varios compartimientos celulares. Estas enzimas tienen diferentes funciones, incluyendo el metabolismo energético (Aconitasa que participa en el ciclo del ácido cítrico, complejos I, II, y III de la cadena respiratoria), el metabolismo del Fe (Proteína I Respondedora al Fe, Ferroquelatasa y Adrenodoxin en el patrón de síntesis del hemo), la síntesis de purinas y la reparación del ADN <sup>(83)</sup>.

Como consecuencia de la deficiencia de FXN, se produce disminución de la actividad de la cadena respiratoria y de la Aconitasa, lo que contribuye a la sobrecarga de Fe mitocondrial con generación de especies reactivas del oxígeno, estrés oxidativo y daño tisular <sup>(43,84,85)</sup>, al tiempo que ocurren disfunciones de otras proteínas en los compartimientos mitocondrial y extramitocondrial <sup>(86,87)</sup>.

*Balance oxidativo.* La deficiencia de FXN conduce al aumento de los niveles de los dos ingredientes de la reacción de Fenton: el Fe aumenta a causa de la síntesis insuficiente de los centros Fe-S; el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aumenta a causa de la disminución de la activación de la cadena respiratoria, como resultado del impedimento de la actividad de los complejos respiratorios I, II, y III que contienen centros Fe-S. Cuando el Fe reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se genera un radical altamente tóxico llamado hidroxil (OH<sup>•</sup>), capaz de ocasionar daño a las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos <sup>(78)</sup>.

Por razones no claras, las células deficientes de FXN tienen habilidad reducida para movilizar las defensas antioxidantes, en particular, para inducir la superóxido dismutasa 2 <sup>(88,89)</sup>. El factor de transcripción Nrf2 (del inglés nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) controla la transcripción de antioxidantes inducibles como la superóxido dismutasa y la catalasa. La inducción de antioxidantes en respuesta a compuestos pro-oxidantes resulta afectada cuando el patrón de señalización es defectuoso <sup>(90)</sup>.

La FXN participa en el control del estrés oxidativo celular al reducir la producción de especies reactivas del oxígeno y protege el ADN nuclear y mitocondrial contra daño oxidativo inducido por Fe <sup>(78,91,92)</sup>.

El daño al ADN se produce de la siguiente manera: la deficiencia de FXN genera defecto en la biogénesis y el ensamblaje de los centros Fe-S, y produce un defecto en la síntesis del hemo y falta de citocromo C. El impedimento de la actividad de transporte de electrones (que es dependiente de la biogénesis de centros Fe-S) y la disminución de citocromo C, ocasiona la producción de mayores niveles de especies reactivas del oxígeno. Debido a la falta de capacidad antioxidante, ocurre daño al ADN. El aumento significativo en el daño persistente del ADN, indica alteración en la capacidad de reparación y en los eventos de señalización de apoptosis. Muchas de las proteínas que participan en la reparación del ADN y en el reconocimiento de daño contienen centros Fe-S <sup>(83,93)</sup>.

Se ha sugerido que la FXN tiene un rol en el control de la supervivencia celular, ya que las células deficientes de FXN son más sensibles al estrés oxidativo y existen evidencias de que ambas muertes celulares, la autofágica y la apoptótica, tienen

lugar en modelos animales deficientes de FXN. En ratones transgénicos knockout para el gen de la FXN se observa letalidad embrionaria <sup>(94)</sup>.

La expresión de la FXN en humanos es muy alta en el corazón y la médula espinal; alcanza expresión media en el hígado, músculo esquelético y páncreas; resulta baja en el cerebelo y mínima en todos los otros tejidos, incluido el cerebro. Lo más destacable de este patrón es que coincide con el patrón de tejidos dañados en los enfermos. El hecho de que no se exprese con niveles elevados en el cerebro es paradójico, ya que es un órgano que consume mucha energía.

Llaman la atención los órganos y tejidos como el hígado y el músculo esquelético, donde la expresión de la FXN es muy alta, sin embargo, no resultan afectados en los individuos con AF. La explicación podría residir en la gran capacidad de regeneración de estos tejidos <sup>(95)</sup>.

Los niveles residuales de FXN en individuos afectados por AF, varían del 5 al 10% de los niveles normales en sangre periférica, de acuerdo a la longitud del gen y al tipo celular. Luego, como la longitud de la expansión del gen determina el nivel de expresión de la FXN, tiene influencia en la severidad del fenotipo <sup>(11)</sup>.

#### **1.2.6. Neuropatología**

*Sistema nervioso periférico.* El principal hallazgo anatomopatológico es un fenómeno de degeneración axonal trans-sináptica retrógrada de los axones, que comienza en la periferia, con pérdida final de neuronas y gliosis secundaria. Existe degeneración de axones mielinizados largos en nervios periféricos, que aumentan con la edad y la duración de la enfermedad. Las fibras no mielinizadas en raíces sensoriales y nervios sensoriales periféricos, resultan escasas <sup>(43)</sup>.

*GRD.* El GRD se encuentra severamente atrófico, lo cual ocasiona ataxia progresiva<sup>(43)</sup>, la pérdida de neuronas sensoriales mielinizadas de diámetro largo causa extinción de los reflejos tendinosos. La atrofia o destrucción activa de las células nerviosas del GRD es un hallazgo temprano e invariable, con mayor afectación en las fibras que se originan más caudalmente<sup>(14,96,97)</sup>.

*Médula espinal.* El deterioro de las columnas sensoriales posteriores es responsable del compromiso severo de los sistemas sensoriales que proveen información al cerebro y cerebelo sobre la posición y velocidad de segmentos corporales, particularmente, en extremidades inferiores, lo que produce la pérdida del sentido de posición y vibración. La falta de información propioceptiva y de retroalimentación al sistema motor afecta los grupos musculares requeridos para discriminar movimientos, y produce ataxia sensorial<sup>(14,96)</sup>.

La degeneración de las columnas posteriores de la médula espinal, la neuropatía sensorial en el GRD y la pérdida de las fibras sensoriales en los nervios periféricos, constituyen características típicas de esta enfermedad<sup>(11)</sup>.

*Tallo Cerebral.* La pérdida de células de los núcleos de los nervios craneales VII, X y XII, explica la debilidad facial, los trastornos del lenguaje y de la deglución<sup>(96)</sup>.

*Cerebelo.* Los pedúnculos cerebelosos medio y superior están disminuidos en tamaño. Existe pérdida de células de Purkinje en el vermis superior del cerebelo y corteza cerebelosa, así como de neuronas en el núcleo olivar inferior. Los tractos espinocerebelosos (ascendentes y descendentes) también se encuentran deteriorados y explican la ataxia cerebelosa de conjunto con las alteraciones de las

columnas de Clark, el núcleo dentado, el vermis superior y los patrones dentatorubrales <sup>(96)</sup>.

*Cerebro.* La lesión histológica principal es la atrofia neuronal severa y la proliferación de terminales sinápticas en el núcleo dentado, denominadas degeneración grumosa. Este núcleo puede ser especialmente susceptible a la AF porque contiene abundante Fe. La degeneración grumosa no siempre afecta todo el núcleo dentado, es más abundante cuando, al menos, algunos cuerpos celulares neuronales persisten y puede estar ausente en casos con pérdida neuronal total <sup>(14,43,96)</sup>.

*Los tractos motores corticoespinales* están atrofiados con disminución relativa al nivel de la unión cervico-medular y degeneración más severa a medida que se avanza hacia abajo en la médula espinal <sup>(43,96)</sup>. Es la degeneración progresiva de *los tractos piramidales* la que lleva a respuesta plantar extensora bilateral y a debilidad muscular en etapas avanzadas de la enfermedad <sup>(11)</sup>.

### **1.2.7. Características clínicas de la enfermedad**

La AF se presenta con ataxia de la marcha (65%) y trastornos en la coordinación de los movimientos de las extremidades (25%), generalmente, a finales de la primera o comienzos de la segunda década de la vida. Los criterios clínicos para su diagnóstico fueron establecidos por Anita Harding, en el año 1984 (Anexo 2).

Clásicamente se produce un síndrome cerebeloso caracterizado por ataxia de la marcha, disartria, dismetría, adiadococinesia, temblor de intención, hipotonía muscular y nistagmo. Las manifestaciones neurológicas no cerebelosas consisten en atrofia muscular, neuropatía periférica sensitiva con pérdida del sentido de posición y

vibración, hipo o arreflexia osteotendinosa, manifestaciones piramidales con respuesta plantar extensora, disfagia, atrofia óptica y sordera sensorineural <sup>(13)</sup>.

En casos raros, la neuropatía sensorial puede estar ausente, incluso después de largos períodos de duración de la enfermedad, a lo que se ha denominado ataxia de Friedreich con reflejos conservados (FARR) (del inglés Friedreich Ataxia with Retained Reflexes) <sup>(98)</sup>.

Las manifestaciones extraneurológicas están dadas por escoliosis, pie cavo, cardiomiopatía y alteraciones del metabolismo de la glucosa. La escoliosis y/o la cardiomiopatía pueden preceder a la ataxia de la marcha en los casos de comienzo temprano. La cardiomiopatía es la causa más frecuente de muerte <sup>(10,13,43)</sup>.

Existen casos raros con edad de comienzo en la sexta o la séptima década de la vida. A la variante que comienza después de los 25 años se le conoce como ataxia de Friedreich de comienzo tardío (LOFA, del inglés Late Onset Friedreich Ataxia) <sup>(13)</sup> y puede presentarse de manera atípica como una ataxia espástica o con signos inusuales como oftalmoplejía, mioclonus o corea <sup>(99)</sup>.

La notable heterogeneidad clínica de la AF la convierte en un diagnóstico probable ante cualquier caso con ataxia recesiva o esporádica, lo que le confiere un valor definitorio al estudio de confirmación molecular. La identificación de características clínicas y epidemiológicas particulares en determinados grupos poblacionales tiene una aplicación práctica para la correcta orientación diagnóstica.

El tamaño de la expansión de GAA del alelo de menor longitud, presenta una relación inversa con la edad de comienzo y una relación directa con la severidad de las manifestaciones neurológicas y la edad temprana de muerte. Aquellos sujetos

con expansiones más cortas tendrán edad tardía de comienzo, un curso más benigno de la enfermedad y algunos no llegarán a ser diagnosticados durante toda su vida <sup>(43)</sup>.

Pero la longitud de las repeticiones de GAA sólo explica el 50% de la variabilidad en la edad de comienzo, otros factores tienen influencia en el fenotipo. Entre estos se encuentran el mosaicismo somático de las expansiones, las variaciones e interrupciones en la secuencia repetitiva, los genes modificadores, los factores ambientales y las variaciones en la secuencia del ADN mitocondrial <sup>(11)</sup>.

La mayoría de los individuos heterocigotos para mutaciones puntuales tienen un fenotipo particular, pero debido al limitado número de enfermos con la misma mutación (Anexo 1) no puede establecerse una fuerte relación fenotipo-genotipo. Se reportan fenotipos atípicos para algunas mutaciones puntuales que están dados por presentación clínica más ligera, con marcha espástica de comienzo temprano, progresión lenta, no disartria, reflejos conservados y ataxia ligera o ausente. Estas mutaciones dan lugar a una proteína que tiene alguna actividad residual <sup>(11)</sup>.

#### **1.2.8. Epidemiología**

Las repeticiones de GAA se expandieron a través de la evolución de los primates con la generación de una premutación potencial de alelos en múltiples loci <sup>(100)</sup>. Mediante análisis de desequilibrio de ligamiento se estimó la antigüedad del evento mutacional fundador de la AF al menos en 682 +/- 203 generaciones (95% intervalo de confianza: 564-801 generaciones). Si se asumen 20 ó 30 años por generación, estos resultados ubican la diseminación de la premutación en Europa occidental, al menos,

9 000 a 14 000 años antes del nacimiento de Cristo, o incluso de 17 000 a 24 000 años antes <sup>(101)</sup>.

Ya que la expansión intrónica está documentada en poblaciones europeas no occidentales, el evento fundador básico responsable de la mutación del gen FRDA (generación de cromosomas que portan ANL, probablemente con origen en África subsahariana) podría ser más antiguo, para ser responsable de la amplia diseminación a través de toda Europa, Oriente Medio y África del Norte <sup>(101)</sup>.

La AF representa casi el 50% de todos los casos de ataxias hereditarias. La mayoría de los estudios refieren una prevalencia de 1/50 000 en poblaciones caucásicas, en las cuales tres cuartos de las ataxias de edad de comienzo antes de los 25 años son AF. La enfermedad nunca ha sido diagnosticada en individuos de algunos grupos étnicos de poblaciones nativas del Lejano Oriente, África subsahariana, Australia y Norteamérica <sup>(11)</sup>.

El origen multiétnico de la población cubana es un elemento que confiere mayor interés al estudio del polimorfismo de GAA, tanto en los sujetos afectados por ataxia como en la población normal.

### **1.2.9. Estrategias terapéuticas**

En la actualidad no existen tratamientos curativos para la enfermedad <sup>(102)</sup>, pero se desarrollan diferentes estrategias con el objetivo de aumentar la expresión de FXN y/o compensar las secuelas de su deficiencia:

*a. Inhibidores de Deacetilasas de las Histonas (HDAC, del inglés histone deacetylase):* algunos compuestos HDAC actúan directamente en las histonas asociadas con el gen FRDA, e incrementan la acetilación en residuos particulares de

lisina en histonas H3 y H4 (H3-K14, H4-K5, y H4-K12). Con esto se ha logrado aumentar la transcripción del gen y los niveles de FXN en células linfoblastoides y linfocitos primarios de sujetos con AF, así como en el modelo de ratón YG8R. Se encuentran en fase pre-clínica <sup>(63,103)</sup>.

*b. Eritropoyetina humana recombinante (rhuEPO):* la FXN aumenta de manera dosis-dependiente después de su incubación con rhuEPO. En ensayo clínico realizado, se aprecia que es bien tolerada y no afecta el hematocrito o la función cardíaca, no obstante, en poblaciones grandes ha ocasionado aumento de la Hemoglobina, aplasia pura de células rojas, aumento de eventos cardiovasculares y de la mortalidad <sup>(104-108)</sup>. Se realiza un ensayo clínico en fase II en Austria <sup>(104)</sup>.

*c. Deferiprone:* es un quelante oral del Fe que penetra rápidamente en las células alcanzando el Fe intracelular, cruza las membranas mitocondriales y es capaz de disminuir los niveles mitocondriales de Fe y con ello el estrés oxidativo y el daño celular, fundamentalmente, en el corazón y el SNC <sup>(109-111)</sup>. Se han utilizado dosis bajas en combinación con la Idebenona, y se aprecia mejoría en las funciones cinéticas, así como en la hipertrofia cardíaca y de los depósitos de Fe en el núcleo dentado. Se realizan ensayos clínicos en fase II en Europa, Australia y Canadá <sup>(109)</sup>.

*d. Análogos de la Coenzima Q10:* el empleo de agentes antioxidantes se considera beneficioso en la AF, los más comúnmente usados son la coenzima Q10 y la Vitamina E <sup>(112-114)</sup>.

La Idebenona es un análogo sintético de cadena corta de la coenzima Q10, actúa como quelante de los radicales libres y facilita el transporte de electrones dentro de la cadena transportadora de electrones, se absorbe mejor dentro del torrente

sanguíneo y cruza la barrera hematoencefálica más fácilmente que la coenzima Q10, con lo que logra mayor disponibilidad dentro del SNC <sup>(115)</sup>. Actualmente se desarrolla un ensayo clínico en fase III con la participación multicéntrica de Estados Unidos y países europeos. Resultados preliminares reportan que no hay modificaciones significativas de la función neurológica en un periodo de seis meses <sup>(116)</sup>.

La Mitoquinona es otro análogo de la coenzima Q10, consiste en una molécula de Idebenona con un ión catiónico de trifenilfosfonio unido al extremo de la cola de carbono, lo que permite su liberación específica en la matriz mitocondrial. Aún no ha sido evaluada en pacientes <sup>(117)</sup>.

*e. Terapia génica:* mediante la expresión del Ácido Desoxiribonucleico copia (ADNc) de la FXN por vectores recombinantes virales adenoasociados y lentivirales, se ha demostrado corrección parcial de la sensibilidad al estrés oxidativo en fibroblastos primarios de enfermos con AF. Los vectores amplicones del Virus Herpes Simple tipo 1 (HSV-1) expresan el ADNc de la FXN, y restauran exitosamente el fenotipo normal <sup>(118)</sup>.

*f.* Recientemente se han generado líneas de *células madres pluripotenciales* derivadas de fibroblastos de la piel de sujetos con AF, que resultan modelos potenciales para el desarrollo de ensayos clínicos; una vez corregido el gen mutado también podrían constituir una fuente de células inmunocompatibles para la terapia de trasplante <sup>(119)</sup>.

## **CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Diseño metodológico**

Se realizó un estudio descriptivo transversal en el período comprendido entre enero de 2006 y julio de 2011, basado en el análisis molecular del gen FRDA en un total de 770 cromosomas, 216 de ellos pertenecientes a individuos afectados por ataxias recesivas o esporádicas (108 sujetos) y 554 a individuos saludables (277 sujetos).

En aquellos individuos afectados por AF se realizó estudio genealógico y evaluación clínica, así como análisis del metabolismo de la glucosa, exámenes imagenológicos, electrofisiológicos y determinación de la longitud de las repeticiones trinucleotídicas de CAG en los genes SCA2, SCA3, SCA17 y HD.

Teniendo en cuenta el estudio del gen FRDA, tanto en los sujetos afectados como en los saludables, se realizó la estimación de diferentes indicadores epidemiológicos como: tasa de prevalencia de enfermos, frecuencia génica y genotípica para el locus FRDA, frecuencia de portador, frecuencia de alelos normales cortos, de alelos normales largos, de alelos raros, de alelos premutados y riesgo de recurrencia de la enfermedad.

### **2.2. Sujetos estudiados**

#### **2.2.1. Sujetos afectados por ataxias recesivas o esporádicas**

Desde el año 2000 el CIRAH ha brindado asistencia médica y ha archivado información clínica, genealógica y molecular correspondiente a las familias cubanas

afectadas por ataxia. Entre los años 2002 y 2004 se realizó una pesquisa activa de enfermos y familiares con riesgo de ataxias hereditarias a nivel nacional, en la cual fueron evaluados todos los individuos afectados <sup>(120)</sup>. De manera activa los casos nuevos, que son diagnosticados con ataxia en los servicios de neurología o pediatría en cualquier región del territorio nacional, son referidos al CIRAH. A partir de esta información fueron identificados en el país un total de 753 enfermos con algún tipo de ataxia.

En la presente investigación se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: sujetos afectados por ataxia progresiva que se presenta con patrón de herencia autosómico recesivo o como caso esporádico.

Como criterios de exclusión se establecieron los antecedentes de intoxicación (por exposición a alcohol, litio, difenilhidantoína, barbitúricos, mercurio, gasolina, solventes, pegamentos o quimioterápicos citotóxicos), la cerebelitis vírica aguda, el síndrome paraneoplásico, el hipotiroidismo, la tabes dorsal, así como la incapacidad para comprender y/o expresar la voluntad mediante el proceso de consentimiento informado. El deseo del individuo de abandonar la investigación fue considerado como criterio de salida.

Se estudiaron un total de 108 individuos, que constituyeron el total de casos afectados por ataxia recesiva o esporádica existentes en el país de acuerdo al criterio de neurólogos o pediatras, para un total de 69 sujetos (63,88%) con ataxia recesiva y 39 casos esporádicos (36,12%).

Las familias con ataxias recesivas estuvieron constituidas por una familia con cuatro hermanos afectados, tres familias con tríos de hermanos afectados, 12 parejas de

hermanos afectados, un individuo afectado cuyo hermano falleció con diagnóstico clínico de AF, 12 primos hermanos y 19 individuos cuyos padres guardaban relación de consanguinidad.

Los individuos afectados se agruparon en 81 familias procedentes de las 14 provincias del país, predominaron las provincias de Ciudad de la Habana (23,15%), Camaguey (11,11%), Villa Clara y Holguín (10,18%) (Anexo 3).

Los 52 enfermos (48,15%) de sexo masculino y los 56 (51,85%) de sexo femenino tenían edades comprendidas entre 3 y 63 años (media de  $31,45 \pm 14,7$  años). La edad de inicio de la enfermedad se encontró en el rango de 1 a 61 años (media de  $14,6 \pm 12,6$  años) y el tiempo de evolución entre los 2 y los 40 años (media de  $16,39 \pm 9,35$  años).

La toma de muestra de sangre para el estudio molecular se realizó en el CIRAH o en el lugar de residencia de los enfermos, en cuyo caso fueron enviadas al CIRAH a través de la red nacional de genética médica.

En aquellos individuos con mutaciones en ambos alelos del gen FRDA, se estableció el diagnóstico molecular confirmatorio de AF y se realizó estudio genealógico, evaluación clínica, análisis del metabolismo de la glucosa, exámenes imagenológicos, electrofisiológicos y determinación de la longitud de las repeticiones trinucleotídicas de CAG en los genes SCA2, SCA3, SCA17 y HD.

Para confirmar el estado de portadores en los padres y los descendientes de enfermos con AF, se realizó estudio molecular del gen FRDA a todos los progenitores, a las parejas de dos sujetos afectados y a sus descendientes. La

pareja de uno de estos descendientes también fue analizada con el objetivo de precisar el riesgo de recurrencia de la enfermedad en la siguiente generación.

### **2.2.2. Sujetos sanos**

Para calcular el tamaño de la muestra necesaria a estudiar molecularmente, con el propósito de estimar la frecuencia de alelos normales largos del gen FRDA en Cuba, se utilizó el software EPIDAT 3.1 (Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados), teniendo en cuenta los siguientes parámetros: total de alelos de la población cubana para el locus FRDA de 22 485 256, proporción esperada del 20%, nivel de confianza del 90%, efecto de diseño de 1,0 y precisión del 2,8%.

El tamaño de la muestra a estudiar resultó 553, por lo que se estudiaron 554 cromosomas pertenecientes a 277 individuos saludables, cuya selección se realizó mediante muestreo aleatorio, tratándose de individuos de la población general procedentes de todas las provincias del país y del municipio especial Isla de la Juventud (Anexo 4), que acudieron al CIRAH como acompañantes, cuidadores, parejas de sujetos afectados o profesionales de la salud.

Se tuvieron en cuenta como criterios de inclusión tener una edad por encima de los 25 años, un examen físico neurológico normal y ausencia de historia personal o familiar de ataxia u otras enfermedades neurológicas. Se estableció como criterio de exclusión la incapacidad para comprender y/o expresar la voluntad mediante el proceso de consentimiento informado, y como criterio de salida el deseo del individuo de abandonar la investigación.

Los 133 sujetos de sexo femenino (48,01%) y los 144 de sexo masculino (51,99%) presentaron un rango de edad entre 26 y 55 años (media de 39,15±8,26 años). A

todos se les realizó toma de muestra de sangre y estudio molecular del gen FRDA en el CIRAH.

### **2.3. Estudios, técnicas y procedimientos realizados**

#### **2.3.1. Estudio genealógico**

Mediante el software Cyrillic versión 3.0 (Cyrillic Software, Reino Unido), fueron construidas las genealogías correspondientes a las familias afectadas por AF con el objetivo de identificar relaciones de consanguinidad, otros sujetos probablemente afectados o individuos en riesgo.

La información necesaria fue obtenida mediante estudio detallado de la historia familiar realizado por genetista clínico al caso índice y sus familiares en el CIRAH.

#### **2.3.2. Evaluación clínica**

El genetista clínico realizó entrevista clínica y confección de historia clínica-genética (Anexo 5) en el CIRAH. En la entrevista se explicaron nuevamente las características de la investigación, así como sus objetivos. La historia clínica incluyó datos generales como edad, sexo, raza, lugar de nacimiento, historia natural de la enfermedad, edad de inicio, edad al diagnóstico, precisando en el interrogatorio la existencia de síntomas relacionados con la enfermedad.

##### **2.3.2.1. Examen neurológico**

El examen neurológico fue realizado por neurólogo y genetista clínico en la consulta de neurología del CIRAH, se tuvieron en cuenta los parámetros establecidos en la Clínica Mayo (Anexo 6) <sup>(121)</sup>. Se aplicó la escala SARA para la determinación cuantitativa del compromiso neurológico (Anexo 7) <sup>(122)</sup>.

##### **2.3.2.2. Examen neuro-oftalmológico**

El examen neuro-oftalmológico se realizó de acuerdo a los parámetros utilizados en la Clínica Mayo <sup>(123)</sup>.

#### **2.3.2.3. Examen cardiovascular**

El examen cardiovascular incluyó la inspección, palpación, percusión y auscultación del aparato cardiovascular <sup>(124)</sup>. Se realizó en la consulta de cardiología del Hospital Docente Provincial “Vladimir Ilich Lenin” de la provincia Holguín.

#### **2.3.3. Estudio del metabolismo de la glucosa**

Se realizó prueba de tolerancia oral a la glucosa en dos horas (PTG) en el laboratorio clínico del Hospital Clínico Quirúrgico “Lucía Íñiguez” de la provincia Holguín. Para la determinación de los niveles de glucosa en plasma venoso se empleó el método enzimático-colorimétrico (glucosa-oxidasa), con lectura en los 505 nm, a partir de 5 µL de plasma, en el Analizador Automático Hitachi 902 (Bioamerican Science, Argentina).

#### **2.3.4. Estudios imagenológicos**

Los estudios consistieron en ecocardiograma, radiografía de columna vertebral y resonancia magnética de cráneo. Los dos primeros fueron realizados en las consultas de cardiología e imagenología del Hospital Docente “Vladimir Ilich Lenin”, mientras que las imágenes por resonancia magnética se obtuvieron en el servicio de resonancia magnética del Hospital Clínico Quirúrgico “Lucía Íñiguez Landín”.

##### **2.3.4.1. Ecocardiograma**

Se realizó ecocardiografía bidimensional y Doppler con un ecocardiógrafo Prosound Alpha 10 (Hitachi Aloka Medical Ltd, EE.UU). Se utilizó un transductor UST 52101 de

1,88-5 megahertz (MHz) que fue posicionado en el borde esternal izquierdo, entre el tercero y quinto espacio intercostal, con el sujeto en posición de decúbito supino. Se analizaron de tres a siete ciclos cardiacos de cada sujeto y se obtuvieron los valores medios de cada medición en cada ciclo cardiaco. Las imágenes ecocardiográficas se obtuvieron a partir del eje largo paraesternal y de la vista de cuatro cámaras apical. Las mediciones se realizaron en modo M.

#### **2.3.4.2. Radiografía de columna vertebral**

Se realizó radiografía de columna tóraco-lumbar en posición anteroposterior y lateral de pies, empleando un sistema radiográfico universal (SEDECAL X PLUS LP PLUS, España).

#### **2.3.4.3. Resonancia Magnética de cráneo**

Para la obtención de las imágenes se utilizó un equipo de 0.23 Teslas PANORAMA (Phylips Medical Systems, EE.UU) con una bobina estándar de cráneo. Se obtuvieron cortes axiales de 5 milímetros (mm) de grosor usando secuencias de FLAIR, T1 y T2, así como cortes sagitales en T1 y T2.

Las imágenes fueron analizadas por dos investigadores, utilizando el sistema informativo de análisis de la imagen "Imagis" (Copyright © D. Ronda, O. Ferrer, N. A. Álvarez, Biofísica Médica 2000-2002, versión 1.30, Octubre 2002) que permite medir la cantidad de tejido existente dentro de la región de interés debido a los cambios en la intensidad de señal tejido/líquido.

Las mediciones se realizaron en el plano mediosagital y plano axial en los pedúnculos cerebelosos medios, teniendo en cuenta los parámetros descritos por Onodera y modificados por Villanueva-Haba <sup>(125)</sup>:

- Corte medio sagital para evaluación de médula cervical: diámetro anteroposterior de médula cervical, diámetro anteroposterior de canal medular y cociente entre diámetro medular y diámetro de canal raquídeo.
- Corte medio sagital para evaluación de cerebelo: área de cerebelo y área de la fosa posterior.
- Corte medio sagital para evaluación de la protuberancia: diámetro anteroposterior de la protuberancia.

### **2.3.5. Estudios electrofisiológicos**

Se realizó electrocardiograma, audiometría y estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva. Se analizaron los potenciales evocados multimodales: somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior, auditivos de tallo cerebral (PEATC) y visuales (PEV).

Para los estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva, así como de potenciales evocados multimodales, se empleó el electromiógrafo Neuropack (Neuropack SIGMA, Japón) y se siguieron los protocolos estandarizados, tomando como valores de referencia los establecidos en el CIRAH para la población cubana <sup>(126)</sup>. Fueron realizados en el laboratorio de neurofisiología del CIRAH.

#### **2.3.5.1. Electrocardiograma**

Para la realización de la electrocardiografía se exploraron las derivaciones bipolares DI, DII y DIII, así como las derivaciones unipolares de miembros (aVR, aVL y aVF) y precordiales (V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub>, V<sub>4</sub>, V<sub>5</sub> y V<sub>6</sub>) <sup>(127)</sup>. Se utilizó un electrocardiógrafo CARDIOCID (COMBIOMED Medical Equipment) de fabricación nacional ubicado en la consulta de cardiología del Hospital Docente “Vladimir Ilich Lenin”.

### **2.3.5.2. Audiometría**

El comportamiento de la audición a través de las vías aérea y ósea se investigó mediante el empleo de un audiómetro radioeléctrico MA31 (Grosses Klinisches Audiometer, Alemania) en una cámara sonoamortiguada perteneciente al servicio de otorrinolaringología del Hospital Docente "Vladimir Ilich Lenin". El sujeto fue ubicado en el interior de la cabina, junto a una ventana de cristal, en posición de sentado con los auriculares colocados en ambos oídos. Se le explicó el proceder y se le solicitó que realizara un gesto con la mano al alcanzar el umbral sonoro.

Se investigó el umbral de intensidad para cada frecuencia y se confeccionó un gráfico, en el eje horizontal se anotaron las frecuencias y en el eje vertical las intensidades. Se estudiaron siete frecuencias diferentes: 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 kilohertzius (kHz) y diez intensidades: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 y 100 decibeles (dB). Primero se exploró la vía aérea y a continuación la vía ósea.

El estudio de la vía aérea se comenzó con una frecuencia de 1000 kHz y se anotó el punto de intersección entre la línea vertical correspondiente a la intensidad y la línea horizontal correspondiente a la frecuencia. A continuación, se estudiaron los umbrales para las frecuencias agudas en orden creciente (2000, 4000, 6000 y 8000 kHz), seguido por las frecuencias graves en orden decreciente (500, 250 y 125 kHz).

Para el estudio de la vía ósea se procedió de igual manera, pero analizando las frecuencias agudas de 1000, 2000 y 4000 kHz y las graves de 500 y 250 kHz.

Finalmente, se unieron todos los puntos conformando para cada oído una curva de umbrales de vía aérea y una curva de umbrales de vía ósea. Para evitar la fatiga del

órgano auditivo se permitió al sujeto un descanso de pocos segundos entre cada umbral explorado.

### **2.3.5.3. Estudios de conducción nerviosa periférica motora**

La conducción nerviosa periférica motora se estudió en los nervios mediano y peroneo profundo, mediante la estimulación supramaximal de los mismos con electrodos de superficie y el registro de las respuestas motoras en músculos inervados por dichos nervios, también mediante electrodos de superficie.

El nervio mediano se estimuló proximalmente a nivel del pliegue del codo, medial al tendón del músculo bíceps braquial y distalmente a nivel del carpo, entre los tendones de los músculos palmar largo y flexor radial del carpo. El registro del potencial motor se realizó en el oponente del pulgar.

El nervio peroneo profundo se estimuló proximalmente por detrás de la cabeza del peroné y distalmente a nivel de la garganta del pie, registrando el potencial motor en el músculo extensor corto de los dedos. Para ambos nervios el electrodo de tierra se colocó entre los electrodos de estimulación y el de registro. Se emplearon estímulos eléctricos rectangulares de 0,2 ms de duración y 1 hertzius (Hz) de frecuencia. Los filtros pasa alto y pasa bajo se fijaron en 20 y 2000 Hz, respectivamente. Se empleó un tiempo de análisis de 30 ms y una sensibilidad de 0,5 mV por división.

A los potenciales así obtenidos se les midió su latencia, amplitud pico a pico y se calculó la velocidad de conducción motora entre ambos sitios de estimulación.

### **2.3.5.4. Estudios de conducción nerviosa periférica sensitiva**

La conducción nerviosa sensitiva se estudió en los nervios mediano y sural.

En el nervio mediano el potencial de acción nervioso se registró con electrodos de superficie, colocados sobre el trayecto nervioso a nivel del carpo, en respuesta a la estimulación supramaximal del III dedo a nivel de su tercera falange. Se empleó un pulso eléctrico rectangular de 0,2 ms de duración con una frecuencia de 1 Hz, un tiempo de análisis de 10 ms, una sensibilidad de 5  $\mu$ V por división y filtros de 20 y 2000 Hz. Se promedió un total de 64 respuestas.

En el nervio sural se estimuló por debajo del maléolo lateral y se registró el potencial sensitivo sobre el trayecto del nervio, lateralmente al tendón de Aquiles, mediante electrodos de superficie. Se utilizaron los mismos parámetros de estimulación y de registro que se emplearon para el nervio mediano y, en los potenciales obtenidos, se midió la latencia, amplitud pico a pico y se calculó la velocidad de conducción sensitiva entre los sitios de estimulación y registro.

### **2.3.5.5. Potenciales Evocados Multimodales**

#### **2.3.5.5.1. Potenciales evocados somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior**

Los PESS del nervio tibial posterior se obtuvieron mediante la estimulación de dicho nervio por detrás del maléolo medial con electrodos de superficie a una frecuencia de 5 Hz y con una intensidad mínima suficiente para provocar una ligera flexión plantar de los artejos. El registro del potencial evocado se realizó en las derivaciones Cz-Fz y el del potencial espinal a nivel de la apófisis espinosa de L1 con electrodos de referencia a nivel de la cresta ilíaca anterosuperior.

Se empleó un tiempo de análisis de 100 ms, una sensibilidad de 5  $\mu$ V por división y un filtraje de 5-1000 Hz para el potencial lumbar y de 5-200 Hz para el cortical. Se

promediaron 2000 respuestas y se replicaron dos o tres veces para lograr una mejor evaluación de los componentes. Se midió la latencia del componente P40 que se obtuvo en la derivación de Cz.

#### **2.3.5.5.2. Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC)**

Los PEATC se obtuvieron en respuesta a la estimulación monoaural a través de audífonos TDH-39, con clicks de condensación a una duración de 100  $\mu$ seg y una intensidad de 95 dB pSPL. El registro se realizó con electrodos de superficie (Ag/AgCl). Se promediaron 2000 respuestas.

Los registros se obtuvieron a partir de un electrodo activo colocado en la derivación Cz y el de referencia, a nivel de la mastoide ipsilateral al lado estimulado, mientras que la mastoide contralateral se utilizó como tierra. La señal electroencefalográfica fue amplificada por un factor de 100 000. La impedancia de los electrodos siempre estuvo por debajo de 5 kilohms (Kohms).

Se empleó un tiempo de análisis de 15 ms, un filtraje de 100-3000 Hz y una frecuencia de estimulación de 17 estímulos por segundos. En cada potencial así obtenido se midieron las latencias absolutas de las ondas I, III y V, así como los intervalos I-III y I-V.

#### **2.3.5.5.3. Potenciales evocados visuales (PEV)**

Los PEV se obtuvieron con electrodos de superficie colocados en el cuero cabelludo, el activo a nivel de la derivación Oz y el de referencia en Fz. Se cortocircuitaron las dos mastoides para ser utilizadas como tierra. Se empleó un tiempo de análisis de 400 milisegundos (ms), un filtraje ente 1-100 Hz y una sensibilidad de 10  $\mu$ V por división.

Se promediaron un total de 200 potenciales en cada ojo, con impedancias por debajo de 5 Kohms y con una ganancia de 100 000. La estimulación a patrón se realizó de forma monocular en condiciones de registros de baja iluminación. En los potenciales obtenidos se midió la latencia del componente P100.

### **2.3.6. Estudio molecular del gen FRDA**

El estudio molecular fue realizado por genetista clínico y técnico de laboratorio, en el laboratorio de neurobiología del CIRAH.

#### **2.3.6.1. Obtención y conservación de muestras de sangre**

Se obtuvo una muestra de 20 mililitros (mL) de sangre venosa periférica de cada individuo, siguiendo los procedimientos estandarizados y las normas de bioseguridad establecidas <sup>(128)</sup>. La sangre fue depositada en tubos cónicos de 50 mL que contenían como anticoagulante 200 microlitros ( $\mu$ l) de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a una concentración de 0,5 molar (M). Las muestras fueron conservadas a temperatura de 8°C hasta el momento de la extracción del ADN.

#### **2.3.6.2. Extracción de ADN genómico**

Se obtuvo ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica mediante procedimientos estandarizados <sup>(129)</sup>. El último paso de centrifugación produjo dos fases separadas por una interfase, la fase superior correspondiente al ADN genómico, el cual fue precipitado con etanol absoluto glacial y lavado tres veces con etanol al 70%.

Una vez eliminado el etanol, el ADN fue secado a 55 °C en una estufa durante una hora. Finalmente, el ADN fue disuelto en una solución hidratante (Puregene, EE.UU).

#### **2.3.6.3. Determinación de la concentración y pureza del ADN**

La concentración y la pureza del ADN fueron cuantificadas mediante un espectrofotómetro BioMate (ThermoSpectronic, EE.UU). Para determinar la concentración se obtuvo la absorbancia de la muestra a 260 nanómetros (nm) y para determinar la pureza se utilizó la proporción de las absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm (260nm/280nm). Cuando este valor se encontró entre 1.5 y 2.0, el ADN se consideró con un buen nivel de pureza según lo reportado <sup>(129)</sup>.

#### **2.3.6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Polimerase Chain Reaction)**

Se realizaron PCRs para amplificar los fragmentos de ADN contenidos en la secuencia repetitiva de GAA en el intrón 1 del gen FRDA, siguiendo el protocolo estandarizado <sup>(52)</sup>.

La mezcla de reacción incluyó 4 µL de los diferentes dNTPs al 2.5 mM, 0.5 µL al 20 µM de los cebadores GAA-104F y GAA-629R, 1 U de Elongasa (Invitrogen<sup>TM</sup>, EE.UU), 5 µL al 5X de Buffer A y Buffer B (Invitrogen<sup>TM</sup>, EE.UU), 200 nanogramos (ng) de ADN genómico y agua miliQ para un volumen final de 50 µL. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, EE.UU).

#### **2.3.6.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Se tomaron alícuotas de 25 µL de los productos de PCR, se mezclaron con 10 µL de una solución de bromo-fenol azul y se depositaron en pocillos independientes de un gel de agarosa al 1,5%, previamente teñido con una solución de 12 µL de bromuro de etidio. El gel fue colocado en una solución de tris-borato-EDTA (TBE) al 0,5X

empleada como buffer de corrida y contenida en una cubeta para electroforesis. Se aplicó una corriente de 125 voltios (V) y 36 miliamperes (mA) durante 4,5 horas.

Para evaluar la calidad de la PCR y realizar una estimación semi-cuantitativa de la longitud de la secuencia repetitiva en el gen FRDA los fragmentos de ADN fueron detectados a través de la iluminación de los geles con luz ultravioleta en un Transiluminador 4000 (Stratagene, EE.UU). Las imágenes fueron captadas y procesadas mediante el sistema Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290 (EDAS290) (Eastman Kodak Company, EE.UU).

En cada corrida electroforética fue incluido un control positivo heterocigótico (genotipo 5/580), un control positivo homocigótico (genotipo 700/700), un control negativo (genotipo 5/5) y dos marcadores de peso molecular de 1 Kb y 250 pares de bases (pb) respectivamente (Invitrogen™, EE.UU) para garantizar la adecuada interpretación de los resultados.

#### **2.3.6.6. Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida, análisis de fragmentos de ADN y determinación del número de repeticiones de GAA**

Se tomó una alícuota de 4 µL del producto de PCR y se mezcló con 3 µL de una solución de bromo-fenol azul y 1 µL de cada marcador de peso molecular interno de 100 pb y 300 pb, respectivamente. Se prepararon, además, dos mezclas consistentes en 4 µL de agua destilada, 2 µL de un marcador de peso molecular externo de 50-500 pb y 3 µL de la solución de bromo-fenol azul.

Las mezclas fueron depositadas en pocillos independientes de un gel de poliacrilamida al 12% en un secuenciador automático de genes ALFexpress II

(Amersham Biosciences, Suecia), utilizando como buffer de corrida una solución de tris-borato-EDTA (TBE) al 0,5X.

Se aplicó una corriente de 660 V, 36 mA y 25 watt (W) de potencia durante cinco horas a una temperatura constante de 55°C. La corrida electroforética fue controlada y supervisada en tiempo real mediante el software ALF DNA Sequence Analyzer (Amersham Biosciences, Suecia). El tamaño de los fragmentos de ADN fue estimado a través del software Allele Links (versión 1.0) (Amersham Biosciences, Suecia).

### **2.3.7. Estudio molecular de otros genes con secuencias trinucleotídicas repetitivas de CAG**

En aquellos sujetos en los cuales se identificó una mutación del gen FRDA, dada por la expansión repetitiva del triplete GAA en el intrón 1, se realizó estudio molecular de otros genes con repeticiones trinucleotídicas de CAG (SCA2, SCA3, SCA17 y HD) con el propósito de identificar posible relación entre el tamaño de la repetición trinucleotídica de CAG y la expresión clínica del gen FRDA.

Para la obtención y conservación de las muestras de sangre, la extracción del ADN genómico y la determinación de la concentración y pureza del ADN, se emplearon las mismas técnicas y procedimientos descritos en los epígrafes 3.3.6.1, 3.3.6.2 y 3.3.6.3.

#### **2.3.7.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Se utilizaron cebadores y protocolos de PCR estandarizados para amplificar los fragmentos de ADN que contienen las secuencias trinucleotídicas repetitivas correspondientes a los genes de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2)<sup>(130)</sup>, tipo 3 (SCA3)<sup>(131)</sup>, tipo 17 (SCA17)<sup>(132)</sup> y la enfermedad de Huntington (HD)<sup>(133)</sup>.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, EE.UU).

#### **2.3.7.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Para realizar la electroforesis en agarosa se tomó una alícuota (8  $\mu$ L) de cada producto de PCR y se mezcló con 2  $\mu$ L de una solución de bromo-fenol azul. Estas mezclas se depositaron en pocillos independientes de un gel de agarosa al 2% teñido con 1.7  $\mu$ L de una solución de bromuro de etidio e inmerso en una solución de tris-borato-EDTA (TBE) al 0.5X empleada como buffer de corrida, todo contenido en una cubeta para electroforesis.

Se aplicó una corriente de 100 V y 36 mA durante 40 minutos. Los fragmentos de ADN fueron detectados a través de la iluminación de los geles con luz ultravioleta en un Transiluminador 4000 (Stratagene, EE.UU). La imagen revelada por el transiluminador fue captada y procesada con el sistema Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 290 (EDAS 290) (Eastman Kodak Company, EE.UU).

En cada corrida electroforética fue incluido un control positivo y un control negativo, así como un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega, Alemania) para la adecuada interpretación de los resultados.

#### **2.3.7.3. Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida, análisis de fragmentos de ADN y determinación del número de repeticiones de CAG**

Para la electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida, el análisis de fragmentos de ADN y la determinación del número de repeticiones de CAG, fueron utilizados los procedimientos descritos en el epígrafe 3.3.7.6.

## **2.4. Variables analizadas**

La operacionalización de las variables se describe en el Anexo 8.

### **2.4.1. En los sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

#### **2.4.1.1. Variables genealógicas**

Consanguinidad, herencia autosómica recesiva y caso esporádico.

#### **2.4.1.2. Variables epidemiológicas**

Edad, sexo y origen ancestral.

#### **2.4.1.3. Variables clínicas**

Antecedentes patológicos familiares de aborto espontáneo, antecedentes patológicos familiares de Diabetes Mellitus, edad de inicio de la enfermedad, edad de inicio de la ataxia, tiempo de evolución de la enfermedad, síntoma y/o signo de presentación, manifestaciones neurológicas cerebelosas, manifestaciones neurológicas no cerebelosas y puntuación total de ataxia según SARA.

#### **2.4.1.4. Variable del estudio del metabolismo de la glucosa**

Glucemia post sobrecarga.

#### **2.4.1.5. Variables de estudios imagenológicos**

##### **2.4.1.5.1. Ecocardiografía**

Cardiomiopatía hipertrófica.

##### **2.4.1.5.2. Radiografía de columna vertebral**

Escoliosis.

##### **2.4.1.5.3. Resonancia Magnética Nuclear de cráneo**

Diámetro anteroposterior de la médula cervical, diámetro anteroposterior del canal medular, cociente entre diámetro medular y diámetro del canal raquídeo, área del

cerebelo, área de la fosa posterior, cociente entre el área del cerebelo y el área de la fosa posterior y diámetro anteroposterior de la protuberancia.

La ubicación de uno de estos parámetros por debajo de dos desviaciones estándar con respecto a la media para la población saludable fue interpretada como evidencia de disminución en las dimensiones de la estructura estudiada <sup>(134)</sup>.

#### **2.4.1.6. Variables electrofisiológicas**

##### **2.4.1.6.1. Electrocardiograma**

Trastornos de repolarización ventricular y trastornos de conducción intraauricular.

##### **2.4.1.6.2. Audiometría**

Intensidad y frecuencia.

##### **2.4.1.6.3. Estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva**

Latencia, amplitud motora, amplitud sensitiva y velocidad de conducción.

##### **2.4.1.6.4. Potenciales Evocados Multimodales**

###### **2.4.1.6.4.1. Potenciales evocados somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior**

Onda P40.

###### **2.4.1.6.4.2. Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC)**

Onda I, onda III, onda V, intervalo I-III e intervalo III-V.

###### **2.4.1.6.4.3. Potenciales evocados visuales (PEV)**

Onda P100.

##### **2.4.1.7. Variables de estudios moleculares**

Alelos FRDA expandidos, genotipo FRDA e inestabilidad intergeneracional.

Para cada uno de los genes con secuencias trinucleotídicas de CAG repetitivas se especificaron: alelos normales, alelos normales largos, alelos expandidos y genotipo.

## **2.4.2. En los sujetos sanos**

### **2.4.2.1. Variables epidemiológicas**

Edad y sexo.

### **2.4.2.2. Variables moleculares**

Alelos FRDA normales, alelos FRDA normales cortos, alelos FRDA normales largos, alelos FRDA raros, alelos FRDA premutados, genotipo homoalélico y genotipo heteroalélico.

## **2.5. Variables dependientes e independientes**

### **2.5.1. Variables dependientes**

Las variables dependientes empleadas fueron la edad de inicio y la puntuación de ataxia según SARA.

### **2.5.2. Variables independientes**

Las variables independientes fueron: tiempo de evolución, alelos FRDA expandidos y genotipo FRDA.

## **2.6. Aspectos éticos de la investigación**

El protocolo de investigación fue aprobado por el Consejo Científico y la Comisión de Ética del CIRAH. Se llevó a cabo en correspondencia con las regulaciones establecidas en las declaraciones de Helsinki y Edimburgo de Octubre del 2000 para las investigaciones médicas con seres humanos.

Tanto los enfermos con AF como los sujetos sanos bajo estudio recibieron un modelo de consentimiento informado (Anexos 9 y 10), que leyeron detenidamente de manera individual. Luego, se realizó una segunda lectura de conjunto con el genetista clínico, durante la cual se ampliaron verbalmente los detalles concernientes a la investigación. Al finalizar se aclararon las dudas existentes y se realizaron preguntas para explorar la comprensión del documento, haciendo énfasis en las vías de comunicación con los investigadores. Todos los participantes confirmaron voluntariamente y por escrito su disposición de participar en el estudio.

Además, los investigadores establecieron un compromiso de confidencialidad referido a la información relacionada con la investigación (Anexo 11).

## **2.7. Análisis y procesamiento estadístico de la información**

### **2.7.1. Cálculo de los indicadores epidemiológicos**

Para el cálculo de los indicadores epidemiológicos se consideró como población total al número de habitantes residentes en Cuba a mitad del año 2011 según el Anuario Estadístico de Cuba <sup>(135)</sup>, el cual fue de 11 242 628 habitantes. Los indicadores estudiados fueron los siguientes:

- Tasa de prevalencia de enfermos.

Se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

Tasa de prevalencia de enfermos = (Total de enfermos en la región en el período en estudio / Población total de esa región en el periodo en estudio) X 100 000 habitantes.

- Frecuencia génica para el locus FRDA: se definió como el número de veces en que un alelo FRDA particular se encontró presente, en relación con el número total de

alelos para el locus FRDA existentes en la población en estudio. Se expresó en proporciones.

- Frecuencia genotípica para el locus FRDA: se definió como el número de veces en que apareció cada uno de los genotipos generados por las combinaciones, dos a dos, de los alelos involucrados en el locus FRDA, en relación con el total de genotipos para este locus en la población en estudio. Se expresó en proporción.
- Frecuencia de portador: se definió como el número de individuos heterocigotos para el gen FRDA en relación con el total de individuos de la población. Se estimó a partir de la frecuencia genotípica del alelo heterocigótico. Se expresó en proporción.
- Frecuencia de alelos normales cortos: se estimó como el número de alelos normales cortos en relación con el total de alelos estudiados. Se expresó en porcentaje.
- Frecuencia de alelos normales largos: se estimó como el número de alelos normales largos en relación con el total de alelos estudiados. Se expresó en porcentaje.
- Frecuencia de alelos raros: se estimó como el número de alelos raros en relación con el total de alelos estudiados. Se expresó en porcentaje.
- Frecuencia de alelos premutados: se estimó como el número de alelos premutados en relación con el total de alelos estudiados. Se expresó en porcentaje.
- Riesgo de recurrencia: es la probabilidad de que un trastorno genético que está presente en un miembro de una familia recurra en otro miembro. Se expresó en proporción.

Se calculó para la descendencia de parejas donde uno de sus miembros es portador de un alelo expandido y el otro proviene de la población general como: múltiplo de la probabilidad de ser portador de cada miembro de la pareja multiplicado por  $\frac{1}{4}$ .

Se calculó, además, para la descendencia de parejas donde uno de sus miembros es portador de un alelo expandido, y en el otro miembro se ha demostrado la presencia de dos alelos normales para el gen FRDA, por lo que el riesgo de ser portador resulta modificado por el análisis mutacional mediante el teorema de probabilidad condicionada de Bayes (Anexo 12) <sup>(136)</sup>.

### **2.7.2. Procesamiento estadístico**

Los datos obtenidos fueron introducidos en una base automatizada utilizando el paquete estadístico "Statistics for Windows" (Release 6, 2003). Para la descripción de las variables estudiadas se realizó análisis de distribución de frecuencia, la caracterización de la forma de la distribución incluyó la utilización de estadígrafos de asimetría y curtosis. La normalidad de los datos fue analizada mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Se utilizaron estadígrafos descriptivos de tendencia central como la media aritmética, la mediana y la moda y estadígrafos de dispersión como rango y desviación estándar. Se realizó el análisis de correlación simple de Spearman para determinar la relación de la edad de inicio de la enfermedad con los alelos FRDA expandidos de menor longitud, los alelos FRDA expandidos de mayor longitud y el genotipo, así como la relación de SARA con el tiempo de evolución.

En los diferentes análisis realizados se consideró significación estadística para valores de  $p \leq 0,05$ .

## **CAPÍTULO III. RESULTADOS**

## **CAPÍTULO III. RESULTADOS**

### **3.1. Epidemiología de la ataxia de Friedreich en Cuba**

De un total de 108 individuos con ataxias recesivas o esporádicas, seis resultaron afectados por AF. Cinco de ellos fueron clasificados como ataxias recesivas con anterioridad, mientras que el sujeto 6 había sido diagnosticado como un caso esporádico. En el Anexo 13 se muestran los árboles genealógicos de estas familias.

La tasa de prevalencia de enfermos con AF resultó de un  $0.053 \times 100\ 000$  habitantes, encontrándose entre  $0,048$  y  $0,058 \times 100\ 000$  habitantes para un intervalo de confianza del 95%. La enfermedad constituye el 8,69% de las ataxias recesivas en Cuba. Si se tienen en cuenta los 753 enfermos, reportados por Velázquez <sup>(28)</sup>, así como los 21 casos esporádicos diagnosticados con posterioridad (total de 774 sujetos), resulta notable la baja frecuencia de la AF entre todos los tipos de ataxias hereditarias (0,77%).

Los individuos afectados se localizaron en las tres provincias más occidentales del país (Pinar del Río, Ciudad de la Habana y Matanzas) (Anexo 14). En todos ellos se identificó a Pinar del Río y/o a España como origen ancestral. La familia paterna del sujeto 1 procede de Pinar del Río y la materna de España. El origen ancestral de los sujetos 2, 3 y 6 es también Pinar del Río. En el caso de los sujetos 4 y 5 sus padres nacieron en Matanzas pero sus abuelos, tanto maternos como paternos, provenían de España.

La frecuencia génica del alelo recesivo resultó 0,00073, mientras que la del alelo dominante es de 0,99927. Para el locus FRDA la frecuencia del genotipo homocigótico recesivo fue de 0.00000053, la del homocigótico dominante 0,99854 y la del heterocigótico 0.00145893. Se estimó una frecuencia de portador de 1 en 685 individuos de la población general.

En cuanto a los sujetos restantes (102 casos), se identificaron antecedentes de consanguinidad en un total de 19 (18,62%), lo que representa el 27,54% de las formas recesivas de ataxias.

### **3.2. Características del gen FRDA en la población normal**

Fueron investigados un total de 554 cromosomas, identificándose 20 variantes alélicas, con un rango desde 5 hasta 22 repeticiones y dos alelos de 31 y 32 repeticiones de GAA, respectivamente (media de  $8,96 \pm 3,30$  repeticiones) (Tabla 1). La distribución de frecuencias correspondiente a los alelos normales tuvo una asimetría de 2,46, debido a una cola positiva que se extendió hasta las 32 repeticiones, así como una curtosis de 9,22.

La mediana fue de 8 repeticiones al igual que la moda, por lo que resultó este alelo el más común (30,32%), seguido por el de 7 (19,13%) y el de 9 (14,25%) repeticiones. Entre los tres representaron el 63,71% del total de alelos (Tabla 1).

Los genotipos más frecuentes fueron 8/8, 7/7 y 9/9 respectivamente. Existieron 149 sujetos homoalélicos (53,79%) y 128 heteroalélicos (46,21%) (Tabla 2).

La frecuencia de ANC fue del 88,98%, mientras que la de ANL resultó 11,02%. La frecuencia de alelos raros fue de 0,36% (dos alelos raros) y la de alelos premutados 0%.

**Tabla 1. Longitud de las repeticiones de GAA en el locus FRDA de los sujetos saludables estudiados.**

<b>Longitud de las repeticiones de GAA</b>	<b>Número de cromosomas</b>	<b>Acumulado</b>	<b>Frecuencia (%)</b>	<b>Frecuencia acumulada (%)</b>
5	29	29	5,23	5,23
6	40	69	7,22	12,45
7	106	175	<b>19,13</b>	31,58
8	168	343	<b>30,32</b>	61,91
9	79	422	<b>14,26</b>	76,17
10	28	450	5,05	81,22
11	30	480	5,41	86,64
12	13	493	2,34	88,98
13	9	502	1,62	90,61
14	6	508	1,08	91,69
15	8	516	1,44	93,14
16	11	527	1,98	95,12
17	12	539	2,16	97,29
18	3	542	0,54	97,83
19	3	545	0,54	98,37
20	5	550	0,90	99,27
21	1	551	0,18	99,45
22	1	552	0,18	99,63
31	1	553	0,18	99,81
32	1	554	0,18	100
<b>Total</b>	<b>554</b>	<b>554</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Tabla 2. Genotipos en el locus FRDA de los sujetos saludables estudiados.**

		Repeticiones de GAA																			
Alelo 1	Alelo 2																			Total	
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	21		32
<b>5</b>	3	2	5	8	6	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	26
<b>6</b>	0	9	3	8	4	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	29
<b>7</b>	0	0	<b>37</b>	6	7	1	0	0	1	1	2	3	2	1	0	0	0	0	0	0	61
<b>8</b>	0	0	0	<b>55</b>	6	4	4	1	3	1	1	3	5	0	2	3	1	1	1	0	91
<b>9</b>	0	0	0	0	<b>24</b>	1	0	0	1	0	0	3	1	0	1	0	0	0	0	1	32
<b>10</b>	0	0	0	0	0	9	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	13
<b>11</b>	0	0	0	0	0	0	8	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<b>12</b>	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5
<b>14</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>15</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<b>17</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	3	11	45	77	47	15	13	8	9	5	7	11	11	3	3	5	1	1	1	1	277

### 3.3. Características del gen FRDA en sujetos afectados

En los seis sujetos afectados por AF se demostraron expansiones del trinucleótido GAA en ambos alelos del gen FRDA, las mismas oscilaron entre 71 y 835 unidades (media de  $500\pm 300$  unidades) y se apreciaron tanto en estado homo (50%) como heteroalélico (50%) (Tabla 3).

**Tabla 3. Sujetos afectados por ataxia de Friedreich según variantes alélicas y genotípicas del gen FRDA.**

Sujetos	Repeticiones de GAA		
	Alelo 1	Alelo 2	Genotipo
1	835	835	1670
2	501	501	1002
3	835	835	1670
4	71	280	351
5	73	148	221
6	501	585	1086
Media $\pm$ D.E	469,33 $\pm$ 342,1	530,66 $\pm$ 282,25	1000 $\pm$ 621,81

*Abreviaturas:* D.E-desviación estándar.

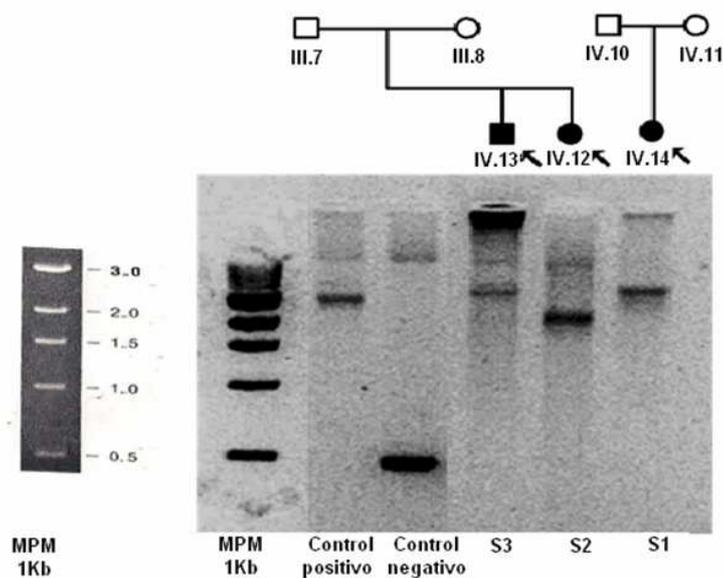
El alelo más corto presentó un rango de 71-835 repeticiones (media de  $469,33\pm 342,1$  repeticiones); mientras que el rango del alelo más largo fue de 148-835 repeticiones (media de  $530,66\pm 282,25$  repeticiones). Los alelos de menor tamaño (71 y 73 repeticiones) representaron el 16,66%, mientras que el 66,66% del total de alelos expandidos estuvo constituido por alelos de más de 500 repeticiones. El alelo de mayor tamaño resultó el de 835 repeticiones.

No se encontró la expansión del trinucleótido GAA en estado heterocigótico (un alelo normal y un alelo mutado) o la existencia de alelos premutados en el resto de los casos estudiados (los cuales permanecieron sin diagnóstico molecular definitivo). Sin embargo, se comprobó la existencia de 22 ANL (10,78%).

### 3.3.1. Inestabilidad meiótica en la transmisión del gen FRDA

#### 3.3.1.1. En sujetos afectados por ataxia de Friedreich

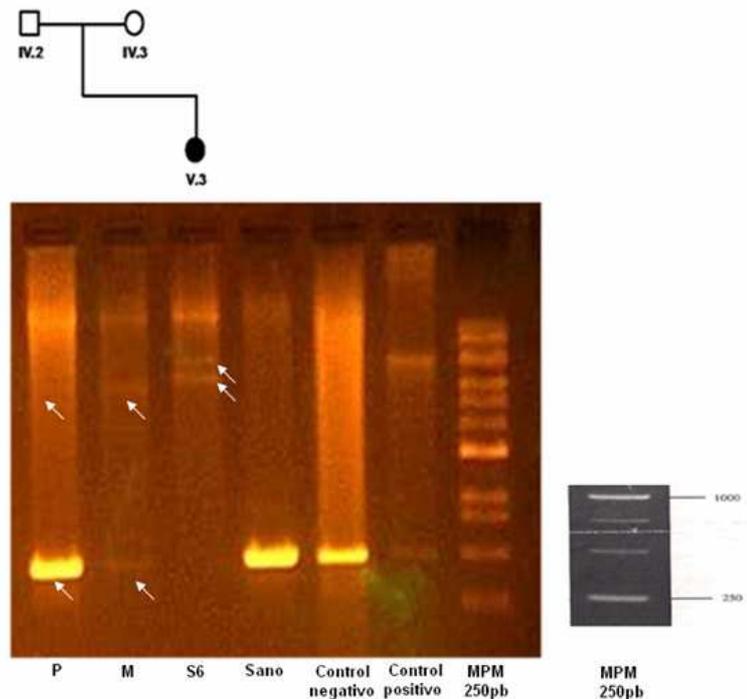
En cinco de los sujetos afectados por AF (83,33%) se demostró inestabilidad meiótica en la transmisión del gen FRDA. Los sujetos 2 y 3 presentaron diferencias notables en cuanto a la expansión del trinucleótido GAA, que se comportó de manera homoalélica para expansiones de 501 repeticiones en el sujeto 2 y de 835 repeticiones en el sujeto 3 (Figura 2).



**Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a los sujetos 1, 2 y 3.**

*Abreviaturas:* MPM 1 Kb-marcador de peso molecular de un kilobase; S3-sujeto 3; S2-sujeto 2; S1-sujeto 1.

El sujeto 6 por su parte heredó dos alelos que sufrieron expansiones durante la transmisión intergeneracional (Figura 3).

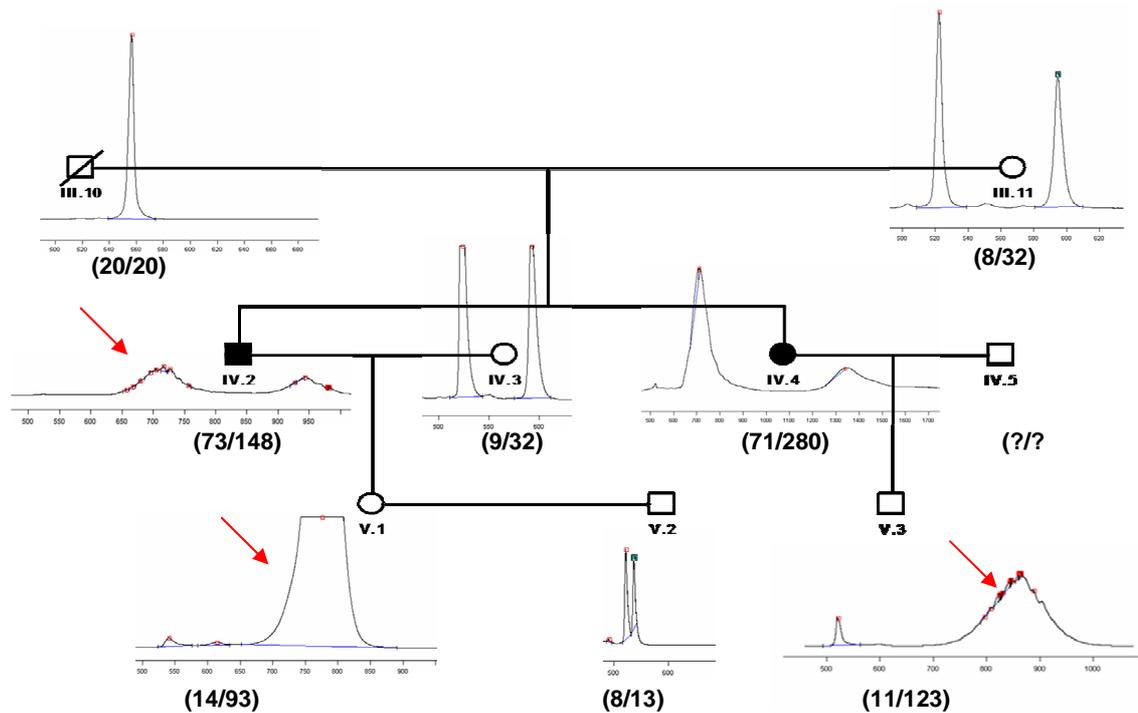


**Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa correspondiente al sujeto 6 y sus progenitores.**

*Abreviaturas:* MPM 250pb-marcador de peso molecular de 250 pares de bases; P-padre; M-madre; S6-sujeto 6.

Los padres de los sujetos 4 y 5 (III.10 y III.11 en la Figura 4) presentaron ANL que no alcanzaron el rango de premutación. El padre (III.10) es homoalélico para dos alelos de 20 repeticiones y la madre (III.11) heteroalélica para un ANC de 8 y un alelo raro de 32 repeticiones, respectivamente. La inestabilidad meiótica consistió en la expansión de los alelos del gen FRDA en los sujetos 4 y 5 (IV.4 y IV.2 respectivamente en la Figura 4), los cuales presentaron un comportamiento

heteroalélico con un primer alelo expandido semejante, pero un segundo alelo de diferentes longitudes (73/148 y 71/280 respectivamente), lo que demostró la ocurrencia de dos mutaciones *de novo*.



**Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida correspondiente a los sujetos 4, 5, sus padres y descendientes.**

*Las flechas indican el mosaicismo somático.*

La pareja del sujeto 5 (IV.3 en la Figura 4), saludable y proveniente de la población general, porta un alelo raro de 32 repeticiones y un ANC de 9 repeticiones, transmitiendo a su descendiente (V.1 en la Figura 4) un ANL de 14 repeticiones. Aún más, sus descendientes (V.3 y V.1 en la Figura 4), presentan también alelos con

diferentes longitudes (11/123 y 14/93), lo que evidenció la inestabilidad meiótica en la transmisión de los alelos del gen.

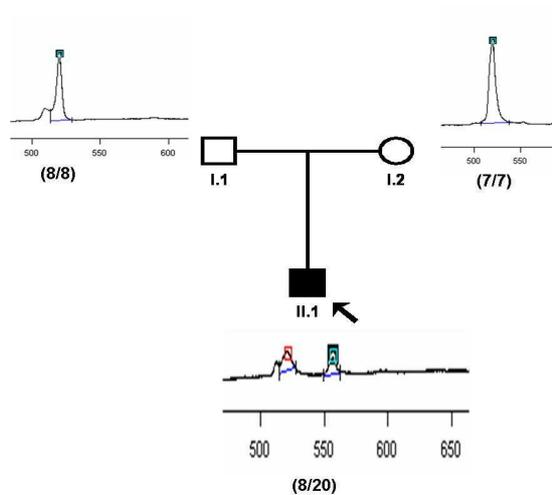
El individuo V.1 (Figura 4), del sexo femenino, con 28 años de edad y saludable, había evitado el embarazo durante 10 años por tener un progenitor afectado con algún tipo de ataxia no determinado molecularmente. Una vez que se implementó el diagnóstico molecular de la AF se confirmó la presencia de la enfermedad en su padre y se demostró en ella el estado de portadora.

Motivada por el temor de dañar la relación con su esposo, solicitó la realización de diagnóstico prenatal en su futuro embarazo, sin la participación del mismo. Después de ser asesorada, ella decidió informar a su pareja, quien solicitó estudio de portador de AF, que determinó la presencia de dos alelos normales para el gen FRDA (genotipo 8/13).

El riesgo *a priori* de esta pareja de tener descendencia afectada por AF era de 1/2 740. El riesgo “modificado” por el análisis mutacional resulta de 1/136 804 (Anexo 12).

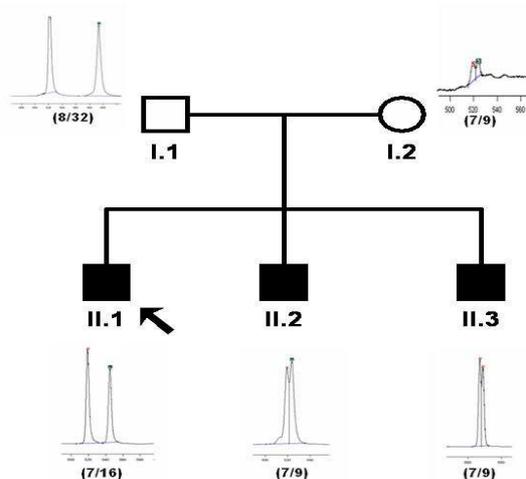
### **3.3.1.2. En sujetos afectados no-ataxia de Friedreich**

En el caso de los sujetos afectados, en los cuales no fue posible determinar la causa de la ataxia, se apreciaron inestabilidades en la transmisión del gen FRDA en dos familias. En la primera de ellas un ANL de 20 repeticiones se originó a partir de un ANC (Figura 5). La segunda familia presentó un ANL de 16 repeticiones que probablemente surgió mediante la contracción de un alelo raro paterno de 32 repeticiones (Figura 6).



**Figura 5. Inestabilidad meiótica del gen FRDA en sujeto afectado por ataxia esporádica no-ataxia de Friedreich.**

*Conversión de un alelo normal corto de 7 repeticiones en un alelo normal largo de 20 repeticiones de GAA.*



**Figura 6. Inestabilidad meiótica del gen FRDA en sujeto afectado por ataxia recesiva no-ataxia de Friedreich.**

*Conversión de un alelo raro de 32 repeticiones en un alelo normal largo de 16 repeticiones de GAA.*

### **3.3.2. Inestabilidad mitótica del gen FRDA**

Al observar la Figura 4 puede apreciarse que los individuos IV.2, V.1 y V.3 presentan múltiples señales en la electroforesis de poliacrilamida, que conforman un área debajo de la curva que se corresponde con diferentes longitudes de varios alelos expandidos, lo cual demuestra la existencia de mosaicismo somático en las repeticiones de GAA como expresión de la inestabilidad mitótica.

### **3.4. Otros genes con secuencias trinucleotídicas repetitivas de CAG en sujetos con ataxia de Friedreich**

En el sujeto 1 se identificó un ANL para la SCA2 con 26 repeticiones del trinucleótido CAG, mientras que en los sujetos 4 y 5 se identificó un ANL de 36 repeticiones de CAG, correspondiente al límite superior de normalidad para el gen de la SCA3. No se apreciaron otros elementos de interés en los demás sujetos o en los genes SCA17 Y HD.

El 66,66% de los genotipos estudiados (16/24) resultaron heteroalélicos. El locus de mayor variabilidad alélica fue el correspondiente al gen SCA3, se identificaron seis alelos con longitudes entre 15 y 36 repeticiones de CAG (media de  $23,91 \pm 6,08$  repeticiones) (Anexo 15).

### **3.5. Características clínicas de la ataxia de Friedreich**

#### **3.5.1. Antecedentes patológicos familiares**

Como antecedentes patológicos familiares resultaron interesantes tres abortos espontáneos en la madre del sujeto 1 antes del nacimiento de su primer hijo (fallecido con AF) (Anexo 13A), así como la existencia de Diabetes Mellitus en el padre y el abuelo paterno de este sujeto.

En el caso de los sujetos 2 y 3, la madre también presentó cuatro abortos espontáneos antes del nacimiento de su primer hijo (Anexo 13B) y la abuela materna resultó afectada por Diabetes Mellitus.

### 3.5.2. Edad de inicio de la enfermedad

La edad de inicio de la AF en Cuba varió entre 7 y 22 años (media de  $13,33 \pm 6,71$  años). En el 66,66% de los casos tuvo lugar antes de los 13 años, mientras que en los dos sujetos con las menores expansiones de GAA, la edad de inicio fue posterior a los 20 pero anterior a los 25 años. No existieron casos clasificados como ataxia de Friedreich de inicio tardío (Tabla 1).

**Tabla 4. Sujetos afectados por ataxia de Friedreich según variables clínicas estudiadas.**

Sujetos	Edad	Edad de inicio de la enfermedad	Edad de inicio de la ataxia	Tiempo de evolución	SARA
1	30	7	16	23	36
2	24	13	22	11	17
3	18	10	11	8	23
4	45	21	21	24	29
5	47	22	22	25	31
6	15	7	9	8	15
Media ±D.E	$29,83 \pm 13,55$	$13,33 \pm 6,71$	$16,83 \pm 5,78$	$16,5 \pm 8,31$	$25,17 \pm 8,26$

*Abreviaturas:* SARA-puntuación total de ataxia según SARA; DE-desviación estándar.

La edad de inicio presentó variabilidad inter e intrafamiliar. Se demostró (mediante el análisis de correlación) una correlación negativa significativa entre esta y los alelos FRDA expandidos de menor longitud ( $r=-0,8913$ ;  $p=0,0171$ ), los de mayor longitud ( $r=-0,8987$ ;  $p=0,0149$ ) y el genotipo ( $r=-0,8983$ ;  $p=0,015$ ) (Anexo 16).

### **3.5.3. Tiempo de evolución de la enfermedad**

El tiempo de evolución de la enfermedad osciló entre 8 y 25 años (media de  $16,5\pm 8,31$  años). Los casos de mayor tiempo de evolución (más de 23 años) se encuentran confinados a la silla de ruedas (sujetos 1, 4 y 5). Los tres sujetos restantes aún deambulan, estos presentan entre 8 y 11 años de evolución.

### **3.5.4. Síntoma y/o signo de presentación**

En cinco de los sujetos (83,33%) el signo de presentación fue la escoliosis, y en el sujeto restante, los trastornos de la marcha de conjunto con la escoliosis. De manera general, el comienzo de la escoliosis precedió a los trastornos de la marcha de uno a nueve años.

### **3.5.5. Manifestaciones neurológicas**

#### **3.5.5.1. Manifestaciones neurológicas cerebelosas**

En todos los sujetos se diagnosticaron al menos siete manifestaciones cerebelosas: ataxia de la marcha y del tronco, temblor postural de cabeza y cuello, disartria, dismetría (Anexo 17), adiadococinesia y temblor de intención (Tabla 5).

La hipotonía muscular estuvo presente en cinco individuos (83,33%) y el nistagmo en cuatro (66,66%).

**Tabla 5. Manifestaciones neurológicas cerebelosas en enfermos con ataxia de Friedreich.**

<b>Síntomas y signos</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Ataxia de la marcha	6	100
Ataxia del tronco	6	100
Temblor postural de cabeza y/o cuello	6	100
Disartria cerebelosa	6	100
Dismetría	6	100
Adiadococinesia	6	100
Temblor de intención	6	100
Hipotonía muscular	5	83,33
Nistagmo horizontal	4	66,66

*N=6*

### **3.5.5.2. Manifestaciones neurológicas no cerebelosas**

Las alteraciones neurológicas no cerebelosas más frecuentes fueron los trastornos en el sentido de posición y vibración y la respuesta plantar extensora, que estuvieron presentes en todos los sujetos. Entre las alteraciones de los reflejos osteotendinosos predominó la arreflexia (83,33%). En uno de los casos existió hiperreflexia (16,67%). En dos sujetos (33,33%) se identificó atrofia parcial del nervio óptico (Tabla 6). El signo de Romberg estuvo presente en el 50% de los casos. No se pudo explorar en el resto debido a las dificultades para la marcha de los mismos.

**Tabla 6. Manifestaciones neurológicas no cerebelosas en enfermos con ataxia de Friedreich.**

<b>Síntomas y signos</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Trastornos en el sentido de posición	6	100
Trastornos en el sentido de vibración	6	100
Reflejos osteotendinosos disminuidos o abolidos	5	83,33
Respuesta plantar extensora	6	100
Atrofia muscular distal	3	50
Atrofia óptica parcial	2	33,33
Sordera sensorineural	0	0

*N=6*

### **3.5.5.3. SARA**

El valor de la escala SARA varió entre 15 y 36 puntos (media de 25,17±8,26 puntos) (Tabla 1). El análisis de correlación demostró una correlación positiva significativa ( $r=0,8699$ ;  $p=0,0243$ ) de la puntuación de la escala SARA con el tiempo de evolución de la enfermedad (Anexo 16).

### **3.5.6. Manifestaciones extraneurológicas**

#### **3.5.6.1. Sistema Osteo-Mio-Articular (SOMA)**

Todos los individuos con AF presentaron escoliosis y pie cavo (Anexo 18). En el sujeto 6 fue necesaria la corrección quirúrgica de la escoliosis y en el sujeto 3 se evidenció una gran severidad de la misma, con presencia de giba (Anexo 19).

#### **3.5.6.2. Aparato cardiovascular**

No se identificaron datos positivos al examen físico del aparato cardiovascular. Mediante la electrocardiografía se diagnosticaron trastornos de repolarización ventricular difusos en todos los sujetos y de la conducción intraauricular en cinco de ellos (83,33%). En la ecocardiografía se apreció hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo en los sujetos 1 y 6.

Resultó un hallazgo el infarto silente del miocardio en el sujeto 5, identificado por la presencia de ondas Q profundas en las derivaciones DII, DIII y aVF del electrocardiograma, y por la existencia de trastornos isquémicos segmentarios (hipokinesia del septum medio apical en la vista de cuatro cámaras) en el ecocardiograma.

### 3.6. Estudio del metabolismo de la glucosa

**Tabla 7. Sujetos afectados por ataxia de Friedreich según prueba de tolerancia oral a la glucosa en dos horas.**

Sujetos	Niveles de glucosa sérica	
	Ayunas (mmol/L)	Dos horas (mmol/L)
1	3,8	6,3
2	4,0	5,0
3	3,1	5,2
4	3,4	5,3
5	5,8	6,1
6	5,8	7,8
Media±D.E	4,31±1,19	5,95±1,04

*Abreviaturas:* DE-desviación estándar.

En ninguno de los sujetos fue posible demostrar la existencia de Diabetes Mellitus mediante PTG (Tabla 7), a pesar que en tres de ellos (1, 2 y 3) existían antecedentes de la enfermedad en familiares de primero y/o segundo grado.

### **3.7. Estudios imagenológicos**

#### **3.7.1. Resonancia Magnética de cráneo**

En el sujeto 6 no fue posible la realización del estudio por presentar ortesis metálica, colocada tras corrección quirúrgica de escoliosis tóraco-lumbar (Anexo 18A).

El diámetro anteroposterior de la médula cervical y el cociente entre el diámetro medular y el diámetro del canal raquídeo se encontraron disminuidos en el 100% de los casos (Anexo 20A), sólo en el sujeto 1 se apreció disminución en el diámetro anteroposterior del canal medular. El área del cerebelo fue normal en el sujeto 2 (16,66%), mientras que el cociente entre el área del cerebelo y el área de la fosa posterior resultó normal en los sujetos 1 y 2 (33,33%). Ambos parámetros estuvieron disminuidos en el resto de los individuos estudiados. El diámetro anteroposterior de la protuberancia se apreció disminuido en los sujetos 3, 4 y 5 (50%) (Anexo 20C).

### **3.8. Estudios electrofisiológicos**

#### **3.8.1. Audiometría**

La audiometría resultó normal en todos los sujetos afectados por AF.

#### **3.8.2. Estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva de nervios mediano, peroneo profundo y sural**

En la Tabla 8 se presentaron los resultados del estudio de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva de los nervios mediano, peroneo profundo y sural.

En los potenciales del nervio peroneo profundo se apreció una caída de amplitud en el sujeto 4 (16,66%), mientras que en el resto de los casos los estudios fueron normales.

Sin embargo, en los estudios de conducción nerviosa periférica sensitiva del nervio mediano se detectó prolongación de latencia con caída de la amplitud en tres casos (50%), en dos de ellos la velocidad de conducción sensitiva estuvo enlentecida. En el resto no se obtuvo respuesta al estimular dicho nervio (sujetos 1, 2 y 3).

Tampoco se obtuvo el potencial en cuatro casos al estimular el nervio sural (sujetos 1, 2, 3 y 4). En los otros dos casos, la amplitud estuvo disminuida en uno y la latencia prolongada en el otro.

### **3.8.3. Potenciales Evocados Multimodales**

En la Tabla 9 se mostraron los resultados de los estudios de los potenciales evocados multimodales.

#### **3.8.3.1. Potenciales evocados somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior**

Los PESS resultaron anormales en el 100% de los casos. En el sujeto 6 se apreció prolongación de la latencia del componente P40, con ausencia de respuesta en el resto de los sujetos (83,33%).

#### **3.8.3.2. Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC)**

En todos los sujetos se constataron potenciales evocados auditivos de poca replicabilidad y con un patrón de trazado inestable como alteraciones cualitativas fundamentales.

**Tabla 8. Estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva de nervios mediano, peroneo profundo y sural en sujetos afectados por ataxia de Friedreich.**

<b>Conducción nerviosa periférica</b>												
<b>Sujetos</b>	<b>Motora</b>						<b>Sensitiva</b>					
	<b>N. mediano</b>			<b>N. peroneo profundo</b>			<b>N. mediano</b>			<b>N. sural</b>		
	<b>Lat (ms)</b>	<b>Amp (mV)</b>	<b>Vel (m/s)</b>	<b>Lat (ms)</b>	<b>Amp (mV)</b>	<b>Vel (m/s)</b>	<b>Lat (ms)</b>	<b>Amp (μV)</b>	<b>Vel (m/s)</b>	<b>Lat (ms)</b>	<b>Amp (μV)</b>	<b>Vel (m/s)</b>
1	10,01	10,0	42,9	11,56	2,8	38,9	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2	9,0	16,4	50,4	12,16	5,5	47,6	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	9,56	16,6	57,0	12,28	12,2	42,3	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	8,62	8,41	54,65	11,42	<b>1,84</b>	51,51	<b>4,98</b>	<b>0,93</b>	<b>28,11</b>	NR	NR	NR
5	7,62	7,85	68,28	11,62	3,68	40,94	<b>4,18</b>	<b>4,33</b>	<b>33,52</b>	1,93	<b>1,27</b>	72,53
6	8,48	12,3	53,4	12,72	3,7	53,4	3,58	<b>4,1</b>	49,11	<b>4,01</b>	5,6	<b>34,9</b>
V.R	8,05	13,66	55,6	10,57	7,20	50,60	2,78	23,32	53,47	2,42	11,38	54,72
± D.E	±0,99	±5,29	±6,44	±1,30	±3,82	±6,34	±0,57	±8,87	±7,30	±0,63	±6,73	±8,55

*Abreviaturas:* V.R-valores de referencia; D.E-desviación estándar; N-nervio; Lat-latencia; Amp-amplitud; Vel-velocidad;

NR-no respuesta.

En cuatro de los casos (66,66%) se apreciaron alteraciones de algunos de los componentes o de los intervalos. En tres de ellos se encontraron latencias prolongadas para el componente I (sujetos 3, 4 y 5). En uno de los casos el componente III resultó anormal (sujeto 3) y en dos casos el componente V (sujetos 3 y 5).

Con relación a las latencias interpicos, dos casos presentaron prolongación para el componente III-V (sujetos 5 y 6) y dos para el componente I-III (sujetos 3 y 5).

#### **3.8.3.3. Potenciales evocados visuales (PEV)**

Los PEV resultaron normales en el 50% de los casos (sujetos 1, 2 y 3). La latencia del componente P100 en el resto de ellos se encontró prolongada con caída de la amplitud.

**Tabla 9. Estudios de potenciales evocados multimodales en sujetos afectados por ataxia de Friedreich.**

Potenciales evocados multimodales													
Sujetos	PESS (ms)	PEATC (ms)										PEV (ms)	
		Oído derecho					Oído izquierdo					Ojo derecho	Ojo izquierdo
		I	III	V	I-III	III-V	I	III	V	I-III	III-V	P100	P100
1	NR	1,50	3,64	5,34	2,14	1,7	1,58	3,66	5,56	2,08	1,90	120	119,4
2	NR	1,52	3,70	5,30	2,18	1,60	1,40	3,62	5,32	2,22	1,7	103,2	106,8
3	NR	<b>1,80</b>	<b>4,02</b>	5,34	2,22	1,32	<b>1,82</b>	<b>4,09</b>	NR	<b>2,27</b>	NR	108,6	114,0
4	NR	<b>1,75</b>	3,65	5,54	1,90	1,89	1,53	3,78	5,46	2,25	1,68	<b>125,05</b>	<b>129,86</b>
5	NR	<b>1,79</b>	3,53	<b>5,95</b>	1,74	<b>2,42</b>	1,37	3,65	5,46	<b>2,28</b>	1,81	<b>3</b>	<b>147,49</b>
6	<b>44,2</b>	1,56	3,53	5,61	1,97	<b>2,08</b>	1,48	3,40	5,58	1,92	<b>2,18</b>	<b>121,38</b>	<b>123,46</b>
V.R	38,40	1,55	3,77	5,66	2,22	1,88	1,56	3,74	5,65	2,18	1,91	120	120
± D.E	±0,253	±0,19	±0,24	±0,28	±0,23	±0,16	±0,22	±0,35	±0,48	±0,11	±0,25		

*Abreviaturas:* V.R-valores de referencia; D.E-desviación estándar; PESS-potenciales evocados somatosensoriales; PEATC-potenciales evocados auditivos de tallo cerebral; PEV-potenciales evocados visuales; NR-no respuesta.

## **CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN**

## **CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN**

### **4.1. Epidemiología de la ataxia de Friedreich en Cuba**

La baja frecuencia de AF (0,77%), en relación con las otras ataxias hereditarias, indica que la causa de las ataxias recesivas en Cuba es diferente a la descrita en otras poblaciones y sugiere la existencia de otros genes candidatos diferentes al gen FRDA.

La elevada frecuencia de individuos sin diagnóstico molecular definitivo (94,44%) está en correspondencia con múltiples estudios que reportan un gran número de casos con ataxias de causa desconocida. Esto se debe a que muchas entidades que se presentan como ataxias recesivas o esporádicas son raras y restringidas a poblaciones aisladas, varias mutaciones causales sólo afectan a una familia (Anexo 1) y las mutaciones presentes en un enfermo en particular, pueden no estar aún descritas <sup>(13,137-139)</sup>.

En la India, Chakravarty y Mukherjee estudiaron 12 enfermos pertenecientes a 8 familias con características clínicas de AF, herencia recesiva y descendientes de matrimonios consanguíneos, y pudieron confirmar la expansión del trinucleótido GAA en una sola familia <sup>(140)</sup>. Schols estudió 124 individuos con ataxia cerebelosa esporádica y encontró AF en 10 de ellos <sup>(141)</sup>. De manera similar, en la región de Alsacia, Francia, de 102 casos analizados sólo 36 resultaron AF <sup>(142)</sup>. En un estudio

de 134 sujetos de la población mestiza mejicana, solo el 10% de los casos presentaron AF <sup>(143)</sup>.

Por el contrario, la AF constituye el 24% del total de casos afectados por ataxias degenerativas en Colombia. Un estudio de 24 sujetos demostró la mutación homocigótica en 20 de ellos y heterocigótica en un sujeto, se planteó, además, un posible efecto fundador de la mutación <sup>(144)</sup>.

Entre los europeos con ataxias recesivas, el 75% son AF y del 96 al 100% de los casos que cumplen con los criterios de Harding, presentan una AF <sup>(10,11)</sup>. En Alsacia, Francia, la prevalencia de la AF es de 0,5 por 100 000 habitantes <sup>(142)</sup>, menor que en Suecia con 1 por 100 000 habitantes y que en España con 4,7 casos por 100 000 habitantes <sup>(95)</sup>.

En Japón se ha estimado una prevalencia de todas las formas de degeneración espinocerebelosa en el orden de 4.53 por 100 000 habitantes, de ellas, el 2.4% resultan AF <sup>(145)</sup>.

La prevalencia de la AF varía ampliamente de un grupo étnico a otro: resulta baja en Noruega <sup>(146)</sup>, Finlandia <sup>(147)</sup>, Méjico <sup>(143)</sup> y rara en Oriente Lejano, África subsahariana y nativos americanos <sup>(73)</sup>. Sin embargo, es la causa más común de ataxias hereditarias entre caucásicos.

Cuba es un archipiélago en el Caribe, cuya población se formó a partir de los criollos (descendientes de españoles mezclados con africanos subsaharianos y amerindios en menor grado), chinos y judíos europeos <sup>(148)</sup>. El hecho de que la AF sea una condición muy rara entre los africanos subsaharianos y nativos americanos, pero muy frecuente en los españoles (representando más de un tercio de todas las ataxias

hereditarias)<sup>(47)</sup> hace de estos últimos los candidatos más atractivos para la posible inclusión de las mutaciones o de los haplotipos de riesgo al fondo genético cubano. La concentración de las familias afectadas en las tres provincias más occidentales del país, y el origen ancestral español en el 50% de los sujetos, constituyen elementos a favor de esta hipótesis. Se precisan estudios moleculares de haplotipaje para confirmar la misma, debido a la gran variedad étnica de la población cubana. Resulta interesante que en la provincia de Holguín, donde se encuentra el mayor número de individuos con SCA2 a nivel mundial<sup>(28)</sup>, no existen sujetos afectados por AF.

La existencia de un segundo locus para la AF denominado FRDA2, localizado en 9p<sup>(45)</sup>, podría ser la causa más importante del fenotipo observado en los 102 sujetos que permanecen sin diagnóstico molecular definitivo. Una segunda explicación podría encontrarse en las mutaciones *de novo* del gen SCA2, originadas a partir de ANL, debido a la elevada frecuencia de estos alelos en la población cubana<sup>(149)</sup>. Es necesario establecer una estrategia para el diagnóstico paulatino de los casos sin diagnóstico molecular confirmatorio.

Se estimó una frecuencia notablemente baja para el alelo recesivo del gen FRDA (0,00073) y para el genotipo homocigótico recesivo (0.00000053). La frecuencia de individuos portadores en Cuba (1 en 685) es similar a la de Finlandia (1 en 500), país donde también se reporta baja prevalencia de la enfermedad<sup>(147)</sup>. Por el contrario, la frecuencia de sujetos portadores en poblaciones europeas alcanza valores de 1 en 25 a 1 en 60<sup>(11)</sup>.

La mayoría de los estudios epidemiológicos internacionales sobre la AF se limitan a regiones geográficas específicas. La realización de un pesquisaje de alcance nacional <sup>(28)</sup> y la continua evaluación mediante especialistas de los casos nuevos en todo el país, con la remisión subsecuente de los mismos al CIRAH, son elementos que limitan el sesgo de selección y contribuyen a la solidez y credibilidad de los resultados obtenidos en la presente investigación.

La marcada heterogeneidad clínica característica de la AF dificulta el establecimiento de un diagnóstico preciso. En casos esporádicos (como el sujeto 6) donde no existen antecedentes de consanguinidad o de otros familiares afectados, no es posible establecer un patrón de herencia autosómico recesivo a través del estudio de la historia familiar.

Estos elementos confieren mayor relevancia a la realización de estudios moleculares en el gen FRDA, considerándose que por su elevada frecuencia la AF ha de ser la primera condición en investigarse y es un diagnóstico probable en la ataxia esporádica, incluso si el comienzo es en la edad adulta <sup>(150)</sup>.

La consanguinidad hace muy probable (aunque no confirma) un patrón de herencia autosómico recesivo. Su presencia en el 18,62% de los sujetos no-AF y en el 27,54% de los individuos afectados por ataxias recesivas, sugiere la participación de genes recesivos diferentes al gen FRDA como causa de la ataxia cerebelosa de estos casos. Lo anteriormente expresado, unido a la existencia en la población cubana de ANL y de alelos raros en el gen FRDA (que son alelos inestables con la capacidad de convertirse en alelos expandidos), señala a la consanguinidad como un importante factor de riesgo.

Más de mil millones de personas en el mundo viven en comunidades con preferencia por matrimonios consanguíneos, donde las uniones intrafamiliares representan del 20 al 50% de todos los matrimonios, lo cual aumenta el riesgo de ocurrencia de enfermedades raras. Mientras menos frecuente es una enfermedad, mayor asociación se encontrará con la consanguinidad, porque disminuye la variación genética y es más común la homocigosis <sup>(151)</sup>.

La consanguinidad es un factor de riesgo modificable mediante asesoramiento genético ofrecido como parte de estrategias de intervención en la comunidad, este debe constituir un objetivo continuo de trabajo para la prevención de la AF y de otras condiciones genéticas.

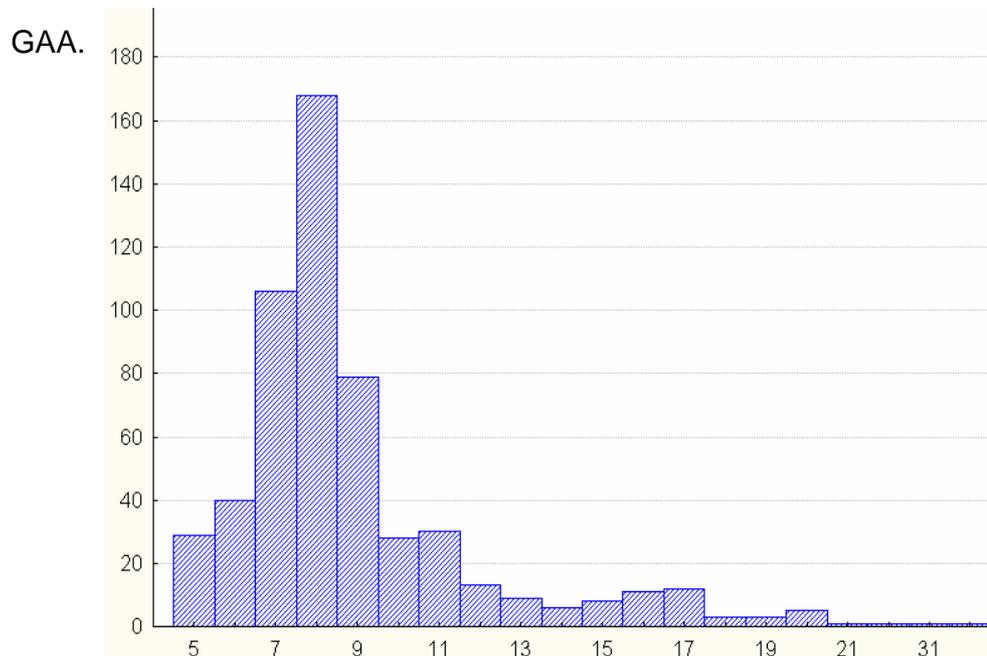
#### **4.2. Predisposición a la inestabilidad del gen FRDA en la población cubana**

La distribución de las repeticiones de GAA en los alelos FRDA de la población cubana resulta diferente a la de otras poblaciones, en esta se aprecia una gran variabilidad alélica (20 alelos diferentes), con asimetría dada por el desplazamiento hacia la izquierda y una distribución leptocúrtica (Gráfico 1).

En la India se reportan 10 variantes alélicas (de 7 a 16 repeticiones de GAA) <sup>(152)</sup> y en la población francesa 22, pero no existen en esta última alelos de 5, 6, 11, 13, 14 y/o 15 repeticiones <sup>(153)</sup>. La población caucásica presenta alelos entre 5 y 23 repeticiones, no obstante solo existen en la misma un total de 13 variantes alélicas <sup>(50)</sup>. En Colombia existen alelos entre 1 y 26 repeticiones <sup>(144)</sup>, mientras que en Turquía el rango se encuentra entre 7 y 34 repeticiones <sup>(154)</sup>.

El alelo más común de la población cubana es el de 8 repeticiones de GAA, mientras que el alelo de 9 repeticiones (tercero en orden de frecuencia en Cuba) resulta el

más frecuente en el resto de las poblaciones <sup>(50,152,153)</sup>. Estos resultados demuestran la existencia de diferencias étnicas en la frecuencia alélica de las repeticiones de GAA.

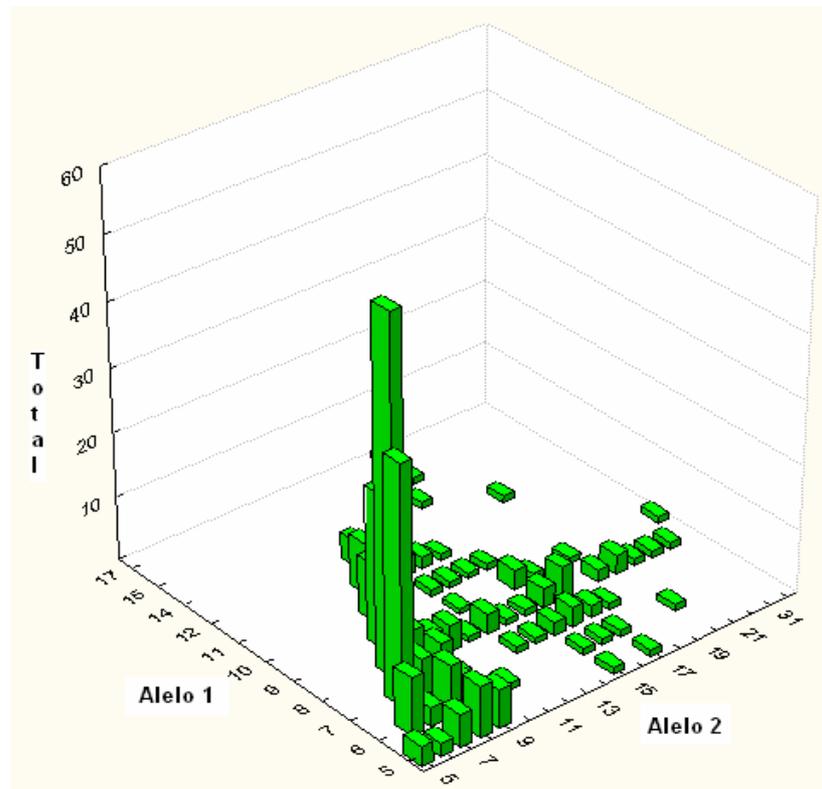


**Gráfico 1. Longitud de las repeticiones de GAA en el locus FRDA de los sujetos saludables estudiados.**

*El eje vertical representa el número de alelos y el eje horizontal representa la longitud de las repeticiones de GAA.*

Fuente: Tabla 1.

La peculiar distribución de estos alelos en Cuba puede atribuirse a una mezcla de genes europeos, amerindios y africanos en los ancestros, este hecho está reforzado por la alta frecuencia de individuos heteroalélicos observada (próxima al 50%) (Gráfico 2).



**Gráfico 2. Genotipos en el locus FRDA de los sujetos saludables estudiados.**

Fuente: Tabla 2.

Resultados semejantes se han encontrado recientemente para el gen de la SCA2 en la población cubana, el cual presenta la mayor variabilidad mundial en el polimorfismo de las repeticiones de CAG <sup>(149)</sup>.

La variabilidad en el número de repeticiones trinucleotídicas existente en diferentes genes hace de estos polimorfismos un marcador genético que podría tener aplicaciones en criminalística, medicina forense y estudios poblacionales como los estudios de mezcla étnica <sup>(155)</sup>. Así mismo, resultan candidatos para investigaciones

en gemelos, estudios de paternidad y, en particular, para la realización de diagnósticos presintomáticos y prenatales.

La Tabla 10 muestra la distribución de frecuencias de ANC y ANL en el locus FRDA de cuatro poblaciones diferentes <sup>(50,152,153)</sup>. De manera similar a Cuba, en la India las repeticiones de GAA tienen una distribución bimodal con un 96% de ANC y un 6% de ANL, que están en relación con la baja prevalencia de la enfermedad <sup>(156)</sup>. Por el contrario, en Colombia el 54,86% de los alelos resultaron ANC y el 45,14% ANL en correspondencia con la elevada prevalencia de la enfermedad <sup>(144)</sup>.

**Tabla 10. Polimorfismo GAA en el locus FRDA en cuatro poblaciones diferentes.I**

Alelos normales		Poblaciones			
		Cubana	India	Caucásica	Francesa
Repeticiones	5-12	89,11%	94,1%	80%	83%
de GAA	13-34	10,89%	5,9%	20%	17%
Rango de alelos		5-32	7-16	5-23	7-34
Alelo más común		8	9	9	9
Número total de alelos		20	10	13	22

Los ANL representan un reservorio para eventos de expansión, posiblemente a través de intermediarios “premutados”, y son capaces de ocasionar la enfermedad en generaciones sucesivas <sup>(49,50,153,155)</sup>. La frecuencia observada de ese tipo de alelos en el presente estudio (10,89%) aporta una explicación para la baja prevalencia de la enfermedad en la población cubana.

La no existencia de alelos premutados o mutados en estado heterocigótico, así como la baja frecuencia de ANL, indican poca predisposición del trinucleótido GAA a la inestabilidad <sup>(157)</sup>, por el contrario, en esta misma población se ha demostrado la concentración más alta de ANL para el gen de la SCA2, en concordancia con la más alta prevalencia a nivel mundial de la enfermedad <sup>(149)</sup>.

### **4.3. Comportamiento del gen FRDA en sujetos afectados**

La identificación de expansiones en el trinucleótido GAA del primer intrón del gen FRDA, permitió establecer por vez primera el diagnóstico molecular definitivo de la AF en la población cubana, así como describir las características del polimorfismo de GAA en individuos sanos y enfermos.

Todas las repeticiones identificadas resultaron mayores de  $(GAA)_{66}$ , en correspondencia con el límite menor de expansión capaz de producir manifestaciones clínicas de la enfermedad, según lo reportado por Campuzano y Filla <sup>(46,52)</sup>. Estos autores describen en sus poblaciones que la mayoría de los alelos expandidos presentan entre 600 y 1200 repeticiones de GAA. En la población cubana también predominan alelos expandidos de gran longitud, pero el rango de las expansiones resulta menor (entre 500 y 835 repeticiones).

Teniendo en cuenta que a partir de los alelos premutados tienen lugar las mayores hiperexpansiones <sup>(46,50,52)</sup> y que en la población cubana estos alelos tienen una frecuencia del 0%, los ANL constituyen la fuente más probable para el origen de alelos expandidos, lo cual explica el menor rango de las repeticiones de mayor tamaño.

En la presente investigación no se identificó ningún sujeto afectado con genotipo heterocigótico para el gen FRDA (un alelo de longitud normal y un alelo expandido). La utilización simultánea de controles positivos homo y heterocigóticos permitió descartar la existencia de alelos nulos en los individuos que resultaron homocigóticos para un alelo normal.

La ausencia de expansión hace el diagnóstico de AF muy improbable, pues no se ha reportado en las poblaciones estudiadas caso alguno dado por dos mutaciones puntuales sin expansión del trinucleótido GAA. Se considera que esto se debe a que los portadores de mutaciones puntuales son raros en la población general, o a que las mutaciones puntuales dobles son letales tempranamente <sup>(53)</sup>. No obstante, la imposibilidad de estudiar las mutaciones puntuales del gen a través del diseño empleado, constituye una limitación del estudio.

Resulta interesante la existencia de ANL en el gen FRDA del 10,78% de los sujetos afectados por ataxias recesivas o esporádicas no-AF, su presencia puede ser producto del azar o de interacciones existentes entre las repeticiones trinucleotídicas de GAA y los genes causales de estas condiciones <sup>(49)</sup>.

#### **4.3.1. Inestabilidad meiótica en la transmisión del gen FRDA**

##### **4.3.1.1. En sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

En los cinco sujetos afectados por AF, en los cuales se demostró inestabilidad meiótica del gen FRDA, se produjeron expansiones, independientemente del sexo del progenitor, lo cual no está en correspondencia con la literatura donde se plantea que en la AF existe mayor tendencia a contracciones paternas e igual tendencia a

contracciones y expansiones maternas <sup>(68)</sup>. Este resultado probablemente está sesgado por el pequeño tamaño muestral.

Debido a que en la presente investigación no se realizaron estudios de haplotipaje, fue imposible determinar con exactitud el origen cromosómico de los alelos expandidos en los descendientes de los sujetos 4 y 5, por esa razón no se logró conocer si ocurrieron expansiones o contracciones en la mencionada generación, pero sí se evidenció la inestabilidad meiótica del gen.

La ocurrencia de dos mutaciones *de novo* a partir de un ANL y un alelo raro en los sujetos 4 y 5 es una evidencia de la importancia que tiene el tamaño de los alelos en la inestabilidad. Ambos alelos (ANL y raros) constituyen alelos intermedios cuya estabilidad intergeneracional es mayor que la de los alelos expandidos, pero menor que la de los ANC <sup>(72)</sup>. El criterio de que todo sujeto afectado por una enfermedad autosómica recesiva es descendiente de portadores obligados no se sustenta en la AF.

Los ANL son alelos de riesgo, sus portadores deben recibir asesoramiento genético relacionado con la probable inestabilidad meiótica del gen, teniendo acceso a programas de diagnóstico prenatal como una de las opciones reproductivas. La estimación del riesgo de recurrencia en descendientes de portadores de ANL debe realizarse con cautela, ante la ausencia de elementos que permitan evaluar con seguridad si se trata de un alelo inestable en cada caso particular.

El comportamiento errático mostrado por los alelos expandidos (expandiéndose o contrayéndose) al pasar de una generación a la siguiente, tiene importantes implicaciones para el asesoramiento genético. El criterio de que todo descendiente

de un sujeto afectado por una enfermedad autosómica recesiva es un portador obligado, resulta inconsistente para la AF ante las evidencias de posibles contracciones del gen FRDA capaces de convertir un alelo expandido en un alelo de longitud normal. Se han demostrado grandes deleciones incluyendo reversión ocasional al tamaño normal en los espermatozoides de varones con AF <sup>(75)</sup>.

Los futuros descendientes de la pareja conformada por V.1 y V.2 (Figura 4) presentan, en teoría, un 50% de probabilidad de heredar un alelo materno expandido y ser portadores, pero el riesgo en ellos de desarrollar la enfermedad es de 1/136 804 (próximo al 0%).

Estos estimados probabilísticos no consideran la posibilidad de que el alelo materno sufra una contracción y alcance una longitud normal en la descendencia, que resultaría no portadora. Tampoco es posible descartar, mediante el estudio realizado, la probabilidad de que el padre presente una mutación puntual del gen FRDA, o que la misma se produzca *de novo* a partir de una expansión de sus alelos de longitud normal, lo que incrementaría el riesgo de afectación para la descendencia.

Hasta tanto no sean identificados todos los factores capaces de provocar inestabilidad meiótica en el gen FRDA, la estimación del riesgo de recurrencia de la enfermedad debe realizarse con precaución.

La significación del estado de portador es personal, en el sujeto V.I el impacto percibido estaba mediatizado por el temor al estigma y por las implicaciones potenciales de la comunicación de la información a su esposo.

La amenaza de una enfermedad hereditaria ocasiona un daño emocional significativo, el estado de riesgo representa un estrés crónico debido a la

incertidumbre y ansiedad experimentadas <sup>(158)</sup>, pero el mantenimiento confidencial de su estado genético habría impedido el asesoramiento genético acertado, así como el ofrecimiento de opciones reproductivas preconcepcionales adecuadas, si ella no hubiese informado a su esposo y no se hubiese obtenido información acerca del posible estado de portador de este.

Muchos individuos consideran que los padres deben aconsejar a los hijos mantener en privado su estado de portadores, ya que podrían sufrir disminución de su autoestima <sup>(159)</sup>. No obstante, el diagnóstico de portadores debe de estar disponible para todos los familiares de un sujeto afectado, así como para sus parejas o las de portadores conocidos. Esto permitiría la adecuada evaluación del riesgo y el asesoramiento genético para la planificación familiar <sup>(160)</sup>.

Con esta investigación se dió comienzo al estudio predictivo de sujetos portadores de mutaciones en el gen FRDA. El diagnóstico predictivo prenatal de la AF es ahora teóricamente posible en Cuba, como una opción reproductiva para parejas en riesgo.

#### **4.3.1.2. En sujetos afectados no-ataxia de Friedreich**

En dos de las familias en las que se desconoce cuál es la causa de la ataxia, se identificó inestabilidad meiótica en la transmisión del gen FRDA. En particular, la conversión de un ANC en ANL es un evento infrecuente, debido a la estabilidad que caracteriza a los ANC <sup>(72)</sup>. Una causa probable para estos hallazgos es el azar, no obstante, la inestabilidad meiótica puede llevar a modulación transgeneracional de la función génica <sup>(161)</sup>.

Aunque en la actualidad resulten desconocidas e incomprendidas, las interacciones existentes entre las diferentes repeticiones trinucleotídicas y entre estas y otros

genes para la regulación del desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central <sup>(49)</sup>, constituyen razones atractivas para explicar el origen de la inestabilidad meiótica y la existencia de ANL del gen FRDA en el 10,78% de los sujetos afectados no-ataxia de Friedreich.

#### **4.3.2. Inestabilidad mitótica del gen FRDA**

El mosaicismo somático identificado en las repeticiones de GAA del gen FRDA, demuestra la existencia en sangre periférica de múltiples subpoblaciones linfocitarias con alelos de diferentes longitudes, que constituyen una fuente dinámica de variación genética con diversidad funcional a nivel molecular, celular y fisiológico. Esta variabilidad permite que la selección somática celular actúe a favor de longitudes repetitivas en tándem específicas en tipos celulares y tisulares particulares, lo que influencia el proceso evolutivo <sup>(48,161)</sup>.

La inestabilidad mitótica observada en la sangre de los sujetos con AF es edad-dependiente, con aumento de la carga mutacional, a medida que el individuo envejece, y se aprecia tendencia a grandes contracciones in vivo <sup>(75)</sup>.

Por el contrario, existen tres tejidos primariamente afectados en la AF en los cuales la frecuencia de largas contracciones es muy baja: el GRD, el cerebelo y el corazón. En el GRD la ausencia de largas contracciones se combina con una alta frecuencia de largas expansiones, lo que sugiere que su alteración progresiva en la AF puede deberse a un mecanismo que favorece las expansiones en ciertas células somáticas y que la inestabilidad somática está mediada por factores tisulares específicos <sup>(74,75)</sup>.

#### **4.4. Comportamiento de las repeticiones trinucleotídicas de CAG en los sujetos con ataxia de Friedreich**

Recientemente se ha descrito que existe una correlación inversa ( $r=-0.81$ ) entre las variaciones en las repeticiones de CAG del gen de la polimerasa del ADN mitocondrial (POLG) y la edad de inicio de la AF. Dicha variabilidad puede constituir un factor predisponente, que en combinación con factores de riesgo ambientales o incluso mutaciones puntuales mitocondriales, afecta la edad de inicio y la progresión de la enfermedad <sup>(162,163)</sup>. Por esta razón, se estudiaron cuatro genes con repeticiones trinucleotídicas de CAG en los individuos afectados por AF.

A pesar de no haberse identificado alelos expandidos para ninguno de los genes estudiados, en tres de los sujetos afectados se identificaron ANL: en uno de ellos para la SCA2 y en los dos restantes para la SCA3. Estos últimos son, además, los sujetos con edad de comienzo más tardía de la enfermedad.

Los polimorfismos de las repeticiones trinucleotídicas proveen una fuente única de variabilidad genómica, al generar diversidad mutacional adicional, sobre la que puede actuar la selección natural.

Se considera que estos polimorfismos son capaces de modular el comportamiento, las funciones afectivas y cognitivas, varios neurotransmisores y sistemas neuromoduladores, así como otros sistemas de neurodesarrollo y señalización. Tienen el potencial de influenciar grandemente la diversidad funcional y la susceptibilidad a enfermedades y son importantes en regular el desarrollo y funcionamiento cerebral, lo que explica la posible interacción entre las diferentes repeticiones trinucleotídicas a lo largo del genoma <sup>(49)</sup>.

La variabilidad alélica para el polimorfismo de CAG observada en los diferentes genes estudiados, es otro elemento que indica diversidad étnica en el fondo genético de esta población.

#### **4.5. Características clínicas de la ataxia de Friedreich**

##### **4.5.1. Antecedentes familiares de interés**

La historia familiar de tres de los casos resultó inusual porque se produjeron varios abortos espontáneos en sus madres antes del nacimiento del primer hijo. A pesar de que no se realizó cariotipo a los padres, y que dos tercios de todas las gestaciones que se pierden son debidas a anomalías cromosómicas, si se tiene en cuenta que estos individuos presentan largas expansiones en el gen FRDA, debe considerarse la hipótesis de que expansiones muy largas de GAA en los fetos pudieron haber ocasionado los abortos, a través de diferentes mecanismos que impidieron la supervivencia fetal <sup>(164)</sup>.

Estos casos pueden constituir una evidencia adicional de que los abortos espontáneos ocurren con mayor frecuencia en sujetos con expansiones muy largas de GAA de la considerada con anterioridad.

Existen varios reportes de abortos que han tenido lugar con mayor frecuencia que lo esperado en otras enfermedades debidas a mutaciones dinámicas, como el Síndrome de Frágil X <sup>(165)</sup>, así como antecedentes de abortos en etapas tempranas y tardías en la Distrofia Miotónica <sup>(166)</sup>.

##### **4.5.2. Edad de inicio de la enfermedad**

La AF tuvo un inicio temprano en las familias cubanas ( $13,33 \pm 6,71$  años), de manera similar a la serie de Harding ( $10,52 \pm 7,4$  años) <sup>(1)</sup> y en correspondencia con lo reportado por otros autores <sup>(11)</sup>.

Es un hecho conocido que en la AF existe una relación inversa entre la longitud de las repeticiones de GAA y la edad de comienzo de la enfermedad <sup>(43,74)</sup>, lo cual se evidenció en los sujetos estudiados (Anexo 16).

Para algunas enfermedades debidas a mutaciones dinámicas (como la SCA2) ha sido posible establecer curvas de probabilidad de manifestar la enfermedad a una edad particular, como función del tamaño específico de las repeticiones trinucleotídicas <sup>(167)</sup>. Estas curvas de probabilidad, o “tablas de vida”, no han sido construidas para la AF debido a la notable variabilidad intra e inter familiar en la edad de inicio de la enfermedad, que no está determinada solamente por la longitud de las repeticiones trinucleotídicas (solo explican el 50% de la variabilidad) <sup>(11)</sup>, sino por otros factores genéticos y ambientales entre los cuales se destacan las demás repeticiones trinucleotídicas ubicadas a lo largo del genoma <sup>(49)</sup> y el mosaicismo somático <sup>(11)</sup>.

#### **4.5.3. Tiempo de evolución de la enfermedad**

La AF es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva. El tiempo de evolución guarda una relación directa con la repercusión clínica en los sujetos afectados, lo cual se evidenció a través del incremento en la puntuación de la escala SARA a medida que el tiempo de evolución resultó mayor.

Se plantea que la edad al diagnóstico es más importante que la longitud de GAA en predecir la cardiomiopatía, la escoliosis y la progresión de la enfermedad <sup>(168)</sup>.

Mediante los estudios moleculares es posible reconocer tempranamente los casos con AF, tal es el caso del sujeto 6, quien presenta el menor tiempo de evolución, y transcurrió sólo un mes desde la sospecha clínica hasta la realización del diagnóstico molecular confirmatorio.

Este resultado avala la importancia del presente estudio, pues la identificación de individuos afectados permite iniciar de manera precoz la neurorehabilitación y el tratamiento medicamentoso. Con la aparición de nuevas terapias en los próximos años debe de mejorar aún más la sobrevida de los mismos <sup>(14,169,170)</sup>.

Además, en parejas de riesgo en edad fértil, cuando el diagnóstico confirmatorio se realiza tempranamente, puede disponerse del diagnóstico prenatal como una de las opciones reproductivas.

#### **4.5.4. Síntoma y/o signo de presentación**

En el 83,33% de los sujetos afectados la escoliosis precedió en varios años a los síntomas neurológicos, pero la ataxia de la marcha fue la primera manifestación reconocida de la enfermedad, tal y como ocurre generalmente <sup>(13)</sup>.

Es con el comienzo de la sintomatología cerebelosa que los sujetos afectados solicitan atención médica. La escoliosis es una manifestación clínica que debe buscarse intencionadamente y no puede interpretarse como independiente del resto de los síntomas, sino como un elemento importante para el diagnóstico de la AF en la población cubana.

#### **4.5.5. Manifestaciones neurológicas**

La presencia de alteraciones cerebelosas y no cerebelosas en los sujetos con AF es un reflejo del extenso daño neurológico que produce la pérdida de función de la proteína FXN.

#### **4.5.5.1. Manifestaciones neurológicas cerebelosas**

El síndrome cerebeloso resultó predominante en todos los sujetos, existió una combinación de manifestaciones de daño en el vermis, cerebelo posterior y en los hemisferios cerebelosos, lo cual es característico en esta condición <sup>(171)</sup>.

Las alteraciones vermianas predominantes fueron la ataxia de la marcha y del tronco. El daño en la región posterior se expresó como disfunción postural y de la marcha, temblor postural de cabeza y/o cuello y alteración de los movimientos oculares, dado por nistagmo, en el 66,66% de los casos. A pesar de que el nistagmo se considera un signo de la enfermedad, algunos autores no lo encuentran en ninguno de sus casos, mientras que otros lo objetivan en todos sus registros <sup>(172-174)</sup>.

Las alteraciones hemisféricas se caracterizaron por disimetría, adiadococinesia, temblor de intención, disartria e hipotonía.

Recientemente se ha demostrado, mediante resonancia magnética espectroscópica, que existe disfunción o pérdida neuronal en el vermis y los hemisferios cerebelosos. Esto justifica la presencia de manifestaciones cerebelosas, tanto vermianas como hemisféricas. La pérdida neuronal es indicada por la disminución de los niveles de N-acetilaspártato, y la gliosis en el vermis es demostrada mediante elevados niveles de mio-inositol y creatina total <sup>(175)</sup>.

#### **4.5.5.2. Manifestaciones neurológicas no cerebelosas**

La abolición de los reflejos osteotendinosos, presente en el 83,33%, de los casos es una evidencia de la pérdida de neuronas largas con sus prolongaciones axónicas en el GRD <sup>(176)</sup>. Estos reflejos pueden estar ausentes incluso antes del comienzo del resto de los síntomas <sup>(1)</sup>.

Los trastornos en el sentido de posición y vibración indican la existencia de degeneración de las columnas sensoriales posteriores de la médula espinal en todos los individuos afectados, hecho que está reforzado por la presencia de signo de Romberg en todos los sujetos en los cuales fue posible su exploración (50%).

La atrofia muscular distal se presentó en los sujetos de mayor tiempo de evolución (sujetos 1, 4 y 5), lo que evidencia la degeneración de la motoneurona del asta anterior de la médula espinal y de sus prolongaciones periféricas. La respuesta plantar extensora demuestra que se ha producido degeneración de los tractos piramidales en todos los sujetos <sup>(11)</sup>.

La atrofia parcial del nervio óptico se identificó en dos de los sujetos con mayor tiempo de evolución (sujetos 4 y 5). Este es un signo que aparece de manera asintomática aproximadamente en el 25% de los casos, pero en algunas series resulta más frecuente <sup>(177)</sup>. Generalmente es de comienzo tardío, lentamente progresiva y rara vez ocasiona pérdida visual severa, aunque se han reportado casos con pérdida de visión catastrófica de rápido comienzo <sup>(178,179)</sup>.

#### **4.5.5.3. SARA**

La correlación positiva existente entre la puntuación de SARA y el tiempo de evolución de la enfermedad (Anexo 16) demuestra que a medida que la deficiencia

de FXN se prolonga en el tiempo la repercusión clínica de su pérdida de función resulta mayor.

Para el estudio de las ataxias cerebelosas han sido desarrolladas numerosas escalas clínicas <sup>(180-186)</sup>. La escala SARA evalúa ocho aspectos que siguen los pasos de un examen neurológico estándar, por lo que se ha utilizado con éxito en diferentes ataxias como la AF <sup>(9,123,187)</sup>.

Todas las escalas clínicas requieren del examen y evaluación de las habilidades de un sujeto por un evaluador entrenado, por lo que constituyen un método parcialmente subjetivo y sujeto a sesgos <sup>(188)</sup>. No obstante, son herramientas necesarias que permiten detectar cambios sutiles pero clínicamente significativos en la evolución del enfermo <sup>(186)</sup>.

En resumen, se apreciaron similitudes entre los hallazgos neurológicos de los sujetos cubanos afectados por AF y los reportados con anterioridad por diferentes autores de otras poblaciones <sup>(1,13,40,43,171-174)</sup>. No ocurrió de igual manera en cuanto a las manifestaciones extraneurológicas.

#### **4.5.6. Manifestaciones extraneurológicas**

##### **4.5.6.1. SOMA**

La escoliosis y el pie cavo no sólo estuvieron presentes en el 100% de los sujetos con AF, sino que la escoliosis fue la manifestación inicial de la enfermedad en la mayoría de los sujetos.

No se trató de una escoliosis congénita en ninguno de los casos, en la cual existe fusión total o parcial o falta de desarrollo vertebral, lo cual ocasiona una curvatura

progresiva <sup>(189)</sup>, sino de curvaturas que fueron progresando a medida que lo hizo la enfermedad.

Los individuos con escoliosis presentan ineficiencia muscular durante la marcha. Esta reducción de trabajo mecánico es interpretada como un proceso de adaptación a largo plazo para economizar energía y enfrentar la pobre eficiencia muscular <sup>(190)</sup>.

Las alteraciones propioceptivas existentes en la AF podrían contribuir a la ocurrencia de escoliosis como un intento del sujeto afectado de recalibrar o reinterpretar las señales propioceptivas mediante la adopción de nuevas estrategias de control motor vestibular y axial. Es frecuente además la sensación dolorosa en la espalda, la cual contribuye a la discapacidad <sup>(191)</sup>.

Milbrandt, en el año 2008, reportó una prevalencia para la escoliosis entre los sujetos con AF del 63%, planteando que los patrones de las curvaturas son variables y no necesariamente semejantes a las curvaturas idiopáticas, las cuales incluyen un componente de rotación más severo que el de la escoliosis secundaria a causas neuromusculares <sup>(192)</sup>.

La escoliosis, como el primer signo precediendo a la ataxia de la marcha, pudiera representar un elemento clínico a ser considerado para el diagnóstico de la AF en las familias cubanas.

#### **4.5.6.2. Aparato cardiovascular**

Los sujetos cubanos con AF presentaron en el electrocardiograma los trastornos de conducción intraauricular y de repolarización ventricular típicos de la enfermedad <sup>(193)</sup>. Estas alteraciones se reportan aproximadamente en el 60-90% de los casos afectados por AF. Los hallazgos más comunes resultan las anomalías de

repolarización manifestadas como inversión de la onda T difusa en miembros inferiores y derivación precordial izquierda <sup>(1)</sup>.

Se han descrito, además, hipertrofia ventricular izquierda, cambios isquémicos, taquicardia atrial, taquiarritmia ventricular y bloqueo atrioventricular. El monitoreo ambulatorio ha revelado disritmias supraventriculares como arresto sinusal y taquicardia <sup>(7,194)</sup>.

En el ecocardiograma de los sujetos estudiados se apreció cardiomiopatía hipertrófica en los sujetos 1 y 6, los cuales presentan 23 y 8 años de evolución, respectivamente. La afectación cardiovascular se considera independiente del proceso neurodegenerativo primario, es decir, la neurodegeneración no predice la alteración cardiovascular.

El ecocardiograma puede detectar el compromiso cardíaco en el 60–100% de los casos, generalmente consiste en una cardiomiopatía hipertrófica concéntrica, simétrica y lentamente progresiva <sup>(195,196)</sup>, que se cree el resultado del daño mitocondrial catalizado por Fe, seguido por necrosis de fibras musculares y por una miocarditis reactiva crónica con fibrosis, aún en ausencia de hipertrofia significativa y anterior al fallo cardíaco <sup>(197-199)</sup>.

Aunque puede ocurrir, la muerte súbita cardíaca es infrecuente <sup>(200)</sup>.

Se habían descrito con anterioridad cuatro casos de infartos del miocardio en enfermos con AF, sólo uno de ellos asociado a lesiones coronarias epicardiales demostradas angiográficamente <sup>(201)</sup>. El sujeto 5 constituye, por tanto, el quinto reporte en la literatura de la ocurrencia de un infarto del miocardio en sujetos con AF <sup>(193)</sup>. La neuropatía autonómica podría ser una explicación para la ausencia de

sintomatología en el mismo, tal como ocurre en individuos afectados por Diabetes Mellitus tipo 2 <sup>(202)</sup>. Esto indica la necesidad de identificar formas incipientes de afectación miocárdica <sup>(203)</sup> y ofrecer seguimiento mantenido para prevenir las complicaciones cardiovasculares.

Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre el número de repeticiones de GAA (en particular del alelo menor) y la cardiomiopatía <sup>(204)</sup>. En general, los sujetos con AF tienen función cardíaca preservada y muchos casos con función sistólica deprimida, muestran mejoría en estudios subsecuentes <sup>(205)</sup>.

#### **4.6. Estudio del metabolismo de la glucosa**

La ausencia de Diabetes Mellitus en todos los sujetos afectados por AF es un hallazgo novedoso de la presente investigación. Estos resultados pueden estar influenciados por el escaso número de casos analizados, no obstante, constituyen una muestra más de la amplia heterogeneidad clínica con que puede manifestarse esta enfermedad.

La disrupción selectiva del gen FRDA en las células  $\beta$  pancreáticas, con frecuencia ocasiona una Diabetes Mellitus progresiva, con alteración en la secreción de insulina debida a disminución en la masa de células  $\beta$  y acumulación de especies reactivas del oxígeno, al tiempo que se produce una resistencia periférica a la insulina. Se ha encontrado además ligamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 al locus FRDA, lo que sugiere un rol de este gen en su patogénesis <sup>(206)</sup>.

La expansión heterocigótica de las repeticiones de GAA en el gen FRDA en individuos portadores saludables, se asocia con resistencia a la insulina y puede considerarse como un co-factor genético en la patogénesis de la Diabetes Mellitus no

insulino dependiente. De manera similar, el incremento en la incidencia de Diabetes en los familiares de sujetos con AF también ha sido descrito <sup>(207)</sup>. La existencia de Diabetes Mellitus en la historia familiar del 50% de los sujetos cubanos afectados por AF puede ser entonces una indicación del estado de portador en los miembros de esas familias.

#### **4.7. Estudios imagenológicos**

##### **4.7.1. Resonancia Magnética de cráneo**

En el sujeto 1 se apreció disminución en el diámetro anteroposterior del canal medular debida a características anatómicas particulares del mismo no relacionadas con la enfermedad; a pesar de que el canal medular resultó estrecho y se convirtió en un elemento confusor, el cociente entre el diámetro medular y el diámetro del canal raquídeo también estuvo disminuido, lo que evidencia la existencia de atrofia medular.

La disminución en el diámetro anteroposterior de la médula cervical y en el cociente entre el diámetro medular y el diámetro del canal raquídeo demostró la existencia de atrofia medular en todos los sujetos estudiados, mientras que el área del cerebelo y el cociente entre el área del cerebelo y el área de la fosa posterior indicaron la presencia de atrofia cerebelosa en la mayoría de los sujetos. Estos resultados son compatibles con los que podrían anticiparse, teniendo en cuenta que la atrofia evoluciona a lo largo del curso de la enfermedad y que se trata de individuos que presentan un período de evolución clínica progresiva de varios años, con dificultades o imposibilidad total para la marcha.

De manera similar, Della Nave observó pérdida significativa de sustancia gris y blanca en el cerebelo y la médula dorsal de los sujetos con AF. Sus estudios de resonancia magnética mostraron adelgazamiento en la porción cervical de la médula espinal, consistente con la degeneración de los tractos posteriores y laterales de la sustancia blanca. Lo más característico en el cerebelo fue la pérdida de neuronas y de fibras mielinizadas en el núcleo dentado <sup>(208,209)</sup>.

Villanueva-Haba <sup>(125)</sup> planteó que, después de la médula espinal y el vermis cerebeloso, la estructura más afectada en la AF es la protuberancia, lo cual se corresponde con los resultados del presente estudio, en el que se demostró atrofia de la protuberancia en el 50% de los casos.

La afectación morfológica observada en la médula espinal cervical, el cerebelo y la protuberancia, provee evidencia *in vivo* de que la enfermedad ha conducido a atrofia de dichas estructuras, tal como se ha demostrado en investigaciones previas <sup>(125,208,209)</sup>.

Recientemente se ha demostrado daño en la porción central de la médula oblongada, porción dorsal superior del puente, porción central del mesencéfalo, región peridentada bilateralmente, quiasma óptico y sustancia blanca subcortical, lo que evidencia una disfunción neuronal más amplia que la considerada anteriormente <sup>(210-212)</sup>.

## **4.8. Estudios electrofisiológicos**

### **4.8.1. Audiometría**

La audiometría resultó normal en todos los individuos, en concordancia con la baja frecuencia de pérdida de audición sensorineural en la enfermedad <sup>(71)</sup>.

#### **4.8.2. Estudios de conducción nerviosa periférica motora y sensitiva de nervios mediano, peroneo profundo y sural**

Un sólo sujeto presentó disminución de la amplitud de la conducción nerviosa periférica motora en nervio peroneo profundo, lo cual sugiere un daño axonal en fibras motoras de dicho nervio. Este es uno de los casos con mayor tiempo de evolución de la enfermedad.

En el sistema nervioso periférico de sujetos afectados por AF la conducción nerviosa motora se encuentra, generalmente, dentro de los rangos normales <sup>(11)</sup>. No obstante, en la serie de casos de Santiago-Pérez, los parámetros de conducción motora muestran tendencia al deterioro con el tiempo de evolución de la enfermedad <sup>(213)</sup>.

Por el contrario, los estudios de conducción nerviosa en la AF muestran de manera característica una neuropatía axonal sensitiva <sup>(13)</sup>, lo cual se evidenció en el estudio a través de la ausencia de respuesta en los nervios mediano y sural del 50% de los casos y el aumento en la latencia, con disminución de la amplitud y la velocidad de conducción en el resto de los sujetos. La disminución de la amplitud demuestra lesión periférica axonal de los nervios en concordancia con la atrofia existente en el GRD <sup>(11)</sup>.

Santiago-Pérez refiere que la neuropatía sensitiva periférica está presente con características similares en cualquier momento de la evolución de la enfermedad, y que no guarda relación con la edad de comienzo o con la duración de la misma <sup>(213)</sup>.

Todos los enfermos desarrollan una neuropatía periférica primariamente sensorial, pero en estadios avanzados se aprecia un componente motor y puede existir una neuropatía sensorimotora distal <sup>(214)</sup>.

### **4.8.3. Potenciales Evocados Multimodales**

#### **4.8.3.1. Potenciales evocados somatosensoriales (PESS) por estimulación del nervio tibial posterior**

En la mayoría de los sujetos (83,33%) el componente p40 de los potenciales evocados somatosensoriales del nervio tibial posterior estuvo ausente, lo que refleja un bloqueo aferente, debido a alteración en la conducción en las columnas posteriores de la médula espinal, como resultado de la degeneración del sistema cordonal posterior y de la reducción del número de células ganglionares en el GRD.

La ausencia de potenciales evocados somatosensoriales es característica en esta condición <sup>(215)</sup>. En todos los casos estudiados por Santiago-Pérez, los PESS de miembros inferiores se encuentran abolidos, con independencia de la edad de comienzo, el tiempo de evolución o el grado de discapacidad, de manera similar a lo que ocurre con la neuropatía axonal sensitiva, razón por la cual ambos pueden considerarse como parte de los criterios diagnósticos de la enfermedad <sup>(213)</sup>.

#### **4.8.3.2. Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC)**

La pobre replicabilidad y el patrón de trazado inestable de los PEATC, indican alteración variable de múltiples neuronas en el patrón auditivo. Los resultados obtenidos demostraron alteraciones, tanto periféricas como centrales, lo que evidencia la existencia de aumento en la dispersión temporal de la conducción nerviosa en su trayecto intraxial a nivel del tronco cerebral de tipo axono-mielínica.

Santiago-Pérez reporta PEATC normales en el 84% de sus casos, y no encuentra relación con el tiempo de evolución ni con el grado de discapacidad <sup>(213)</sup>. Sin embargo, De Pablos encontró PEATC anormales en 10 de 18 casos (55,55%), y

planteó la existencia de una degeneración combinada de las porciones periféricas y centrales de la vía auditiva <sup>(216)</sup>, similar a la identificada en el presente estudio.

Las respuestas preneurales normales de conjunto con la neuropatía auditiva, son consistentes con la evidencia histológica que muestra estructuras cocleares preservadas (órgano de corti y células ciliadas), con daño selectivo del nervio auditivo, así como degeneración primaria de las células ganglionares espirales, análogas a la degeneración del GRD. Actualmente, se plantea que existe afectación en la comprensión del lenguaje determinada por dificultades en el procesamiento auditivo, no necesariamente relacionada con la detección de los sonidos <sup>(217,218)</sup>.

#### **4.8.3.3. Potenciales evocados visuales (PEV)**

La prolongación en la latencia del componente P100, con caída de la amplitud en el 50% de los casos, indica existencia de lesión axono-mielínica en las fibras que conforman la vía visual. Las respuestas evocadas visuales en la AF usualmente se encuentran reducidas en amplitud con prolongación de la onda P100. En la mayoría de las series, entre el 30% y 70% de los casos, muestran PEV alterados <sup>(11,172,177,213,219)</sup>.

Los resultados obtenidos en la presente investigación no permiten plantear que la AF es la enfermedad predominante dentro del grupo de las ataxias recesivas y esporádicas en Cuba, los sujetos afectados presentan las manifestaciones clásicas de la enfermedad pero se distinguen fenotípicamente de los enfermos de otras poblaciones, y no fueron identificados individuos portadores de la mutación dentro de la población normal estudiada, por lo que estos elementos de la **hipótesis** han sido refutados en términos experimentales, arribándose a las siguientes conclusiones:

## **CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES**

- 1) Existe una baja prevalencia de la ataxia de Friedreich en Cuba.
- 2) La baja frecuencia de ataxia de Friedreich, en relación con el resto de las ataxias hereditarias, indica que la causa de las ataxias recesivas en Cuba es diferente a la descrita en otras poblaciones y sugiere la existencia de otros genes candidatos diferentes al gen de la ataxia de Friedreich.
- 3) Los alelos normales largos constituyen la fuente más probable para el origen de alelos expandidos en el gen de la ataxia de Friedreich en Cuba.
- 4) La baja frecuencia de alelos normales largos y la ausencia de alelos premutados o mutados en estado heterocigótico, indican poca predisposición del gen de la ataxia de Friedreich a la inestabilidad en la población cubana saludable, y aportan una explicación para la baja prevalencia.
- 5) La variabilidad del polimorfismo de GAA, identificada en el gen de la ataxia de Friedreich, muestra diferencias étnicas significativas entre la cubana y otras poblaciones estudiadas.
- 6) La inestabilidad meiótica, constatada en el gen de la ataxia de Friedreich de los individuos afectados, hace inconsistentes, para esta enfermedad, los criterios de que tanto los progenitores como los descendientes de sujetos afectados por condiciones autosómicas recesivas son portadores obligados.

7) Las características fenotípicas identificadas en los enfermos cubanos con ataxia de Friedreich los diferencian de los sujetos afectados en otras poblaciones. Los enfermos cubanos no desarrollan Diabetes Mellitus y la escoliosis representa en ellos el signo inicial, precediendo en varios años a la aparición del resto de las manifestaciones clínicas.

## **RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

- 1) Implementar el estudio de las mutaciones puntuales descritas en el gen de la ataxia de Friedreich, desarrollar una estrategia para el diagnóstico de las ataxias recesivas y esporádicas en los sujetos no-ataxia de Friedreich y realizar evaluación prospectiva a los familiares de sujetos con ataxia aparentemente esporádica.
- 2) Realizar estudios de haplotipaje en las familias afectadas por ataxia de Friedreich para conocer si la mutación del gen FRDA tiene en ellas un origen común o si se trata de mutaciones *de novo* originadas de un grupo de alelos normales largos en la población. En ambos casos, resulta importante promover acciones de salud encaminadas a prevenir la consanguinidad.
- 3) Tratar extensamente las implicaciones de la inestabilidad meiótica del gen FRDA durante las sesiones de asesoramiento genético a las familias con ataxia de Friedreich, y poner a su disposición los estudios predictivos para la identificación de portadores o enfermos presintomáticos, así como los diagnósticos prenatales. Estos últimos también deben estar disponibles para sujetos saludables portadores de alelos normales largos.
- 4) En todo sujeto con ataxia de Friedreich es preciso identificar formas incipientes de afectación miocárdica para prevenir las complicaciones cardiovasculares.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders. Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne and New York 1984.
2. Tallaksen CM. Hereditary ataxias. Tidsskr Nor Laegeforen. 2008; 128(17): 1977-1980.
3. Neuromuscular [Internet]. Washington University School of Medicine: Ataxias, Classification; c2006-2010 [actualizado 12 Dic 2010; citado 14 Dic 2010]. [aprox. 10 pantallas]. Disponible en: <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/ataxia/aindex.html>
4. Velázquez PL, Rodríguez LR, García RJ, Almaguer ML, Cruz MT, Laffita MJ. A Comprehensive Review of Spinocerebellar Ataxia Type 2 in Cuba. Cerebellum. 2011; 10: 184-198.
5. Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. Lancet Neurol. 2010; 9: 885-894.
6. Paciorkowski AR, Shafrir Y, Hrivnak J, Patterson MC, Tennison MB, Clark HB, et al. Massive expansion of SCA2 with autonomic dysfunction, retinitis pigmentosa, and infantile spasms. Neurology. 2011; 77: 1055-1060.
7. Lastres-Becker, Rüb U, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). Cerebellum. 2008; 115-124.
8. Manto M, Marmolino D. Cerebellar ataxias. Curr Opin Neurol. 2009; 22: 419-429.

9. Delatycki MB. Evaluating the progression of Friedreich ataxia and its treatment. *J Neurol.* 2009; 256(1): 36-41.
10. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Arch Neurol.* 2008; 65:1296-1303.
11. Pandolfo M. Friedreich ataxia: The clinical picture. *J Neurol.* 2009; 256(1): 3-8.
12. Punga T, Buhler M. Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol Med.* 2010; 2(4): 120-129.
13. Embiruçu EK, Martyn ML, Schlesinger D, Kok F. Autosomal recessive ataxias: 20 types, and counting. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009; 67(4): 1143-1156.
14. Koeppen AH, Morral JA, McComb RD, Feustel PJ. The neuropathology of late-onset Friedreich's ataxia. *Cerebellum.* 2011; 10 (1): 96-103.
15. Almaguer MLE, González ZY, Cuello AD, Almaguer GD, Laffita MJ, Aguiar SJ, et al. Age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients is affected by junctophilin-3 CTG repeat polymorphism [resumen]. *Clin Neurophysiol.* 2008; 119(2): S173.
16. Almaguer-Mederos LE, Almira YR, Góngora EM, Gotay DA, Zaldívar YG, Pupo RE, et al. Antigliadin antibodies in Cuban patients with spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79: 315-317.
17. Almaguer-Mederos LE, Proenza CL, Rodríguez Almira Y, Escalona Batallán K, Santos Falcón N, Martínez Góngora E, et al. Age-dependent risks in genetic counseling for spinocerebellar ataxia type 2. *Clin Genet.* 2008; 74: 571-573.
18. Medrano-Montero J, Velázquez-Pérez L, Canales ON, Rodríguez LR, González ZY. Electroneurografía de nervios craneales en ataxia espinocerebelosa tipo 2. *Rev Neurol.* 2009; 49(5): 278-279.

19. Montes-Brown J, Sánchez-Cruz G, García AM, Báez ME, Velázquez-Pérez L. Heart rate variability in type 2 spinocerebellar ataxia. *Acta Neurol Scand.* 2010; 122(5): 329-335.
20. Paneque M, Lemos C, Sousa A, Velázquez L, Fleming M, Sequeiros J. Role of the disease in the psychological impact of pre-symptomatic testing for SCA2 and FAP ATTRV30M: experience with the disease, kinship and gender of the transmitting parent. *J Genet Couns.* 2009; 18: 483-493.
21. Rodríguez JC, Velázquez L, Sánchez G, Almaguer L, Almaguer D, García JC, et al. Evaluación de la restauración neurológica en pacientes con ataxia SCA2 cubana. *Plast and Rest Neurol.* 2008; 7(1): 13-18.
22. Rodríguez-Labrada R, Velázquez-Pérez L, Siegfried C, Ziemann U, Sánchez-Cruz G, Canales-Ochoa N, et al. Saccadic movements in SCA2. From disorders to electrophysiological biomarkers for genetic and clinical research [resumen]. *Clin Neurophysiol.* 2008; 119(S): 176.
23. Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, Canales-Ochoa N, Sánchez-Cruz G, Galicia-Polo L, García-Aguilera R, et al. Sleep pathology characterization in the asymptomatic carriers of the SCA2 mutation [resumen]. *Clin Neurophysiol.* 2008; 119(S): 161.
24. Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, Medrano-Montero J, Sánchez-Cruz G, Canales-Ochoa N, Torres-Parra C, et al. Patrón electromiográfico en enfermos y portadores asintomáticos de la mutación SCA2 [carta]. *Rev Neurol.* 2009; 49(1): 55-56.

25. Velázquez-Pérez L, Seifried C, Abele M, Wirjatijasa F, Rodríguez-Labrada R, Santos-Falcón N, et al. Saccade velocity is reduced in presymptomatic spinocerebellar ataxia type 2. *Clin Neurophysiol.* 2009; 120: 632-635.
26. Velázquez-Pérez L, Díaz R, Pérez-González R, Rodríguez-Labrada R, Medrano J, Sánchez G, et al. Motor decline in clinically presymptomatic spinocerebellar ataxia type 2 gene carriers. *PLoS ONE* [Internet]. 2009 Apr [citado 10 Oct 2010]; 4(4):[aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.plosone.org/mmwrr/preview/mmwrrhtml/0005398.htm>
27. Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, Canales-Ochoa N, Sánchez-Cruz G, Fernández-Ruiz J, Medrano Montero J, et al. Progression markers of spinocerebellar ataxia 2. A twenty years neurophysiological follow up study. *J Neurol Sci.* 2010; 290: 22-26.
28. Velázquez PL, Sánchez CG, Santos FN, Almaguer ML, Escalona BK, Rodríguez LR, et al. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguín. *Neuroscience Letters.* 2009; 454: 157-160.
29. Velázquez PL. *Ataxia espinocerebelosa tipo 2. Principales aspectos neurofisiológicos para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.* Segunda Edición. Colombia: Ed. Holguín. 2008.
30. Delplanque J, Devos D, Vuillaume I, De Becdelievre A, Vangelder E, Maurage CA, et al. Slowly progressive spinocerebellar ataxia with extrapyramidal signs and mild cognitive impairment (SCA21). *Cerebellum.* 2008; 7: 179-183.
31. Ikeda Y, Daughters RS, Ranum LP. Bidirectional expression of the SCA8 expansion mutation: one mutation, two genes. *Cerebellum.* 2008; 7: 150-158.

32. Knight MA, Hernández D, Diede SJ, Dauwerse HG, Rafferty I, van de Leemput J, et al. A duplication at chromosome 11q12.2-11q12.3 is associated with spinocerebellar ataxia type 20. *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 3847-3853.
33. Mariotti C, Brusco A, Di Bella D, Cagnoli C, Seri M, Gellera C. Spinocerebellar ataxia type 28: a novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum.* 2008; 7: 184-188.
34. Sato N, Amino T, Kobayashi K, Asakawa S, Ishiguro T, Tsunemi T, et al. Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)<sub>n</sub>. *Am J Hum Genet.* 2009; 85(5): 544-557.
35. Storey E, Bahlo M, Fahey M, Sisson O, Lueck CJ, Gardner RJ. A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30. *J Neurol Neurosurg Psychiat.* 2009; 80: 408-411.
36. Verbeek DS. Spinocerebellar ataxia type 23: a genetic update. *Cerebellum.* 2009; 8: 104-107.
37. Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, Plumari M, Battaglia G, Pastore A, et al. Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet.* 2010; 42(4): 313-321.
38. Yuan Y, Zhou X, Ding F, Liu Y, Tu J. Molecular genetic analysis of a new form of spinocerebellar ataxia in a Chinese Han family. *Neuroscience Letters.* 2010; 479(3): 321-326.
39. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *Nature.* 1991; 352: 77-79.

40. Verkerk AJ, Pierretti M, Sutcliffe JS, Fu HY, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CCG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in Fragile X Syndrome. *Cell*. 1991; 65: 905-914.
41. Friedreich N. Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie*. 1863; 26: 391-419. Alemán.
42. Erb WH. Über Sehnenreflexe bei Gesunden und bei Rückenmarkskranken. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1875; 5: 792-802. Alemán.
43. Koeppen AJ. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis and molecular genetics. *J Neurol Sci*. 2011; 303(1-2): 1-12.
44. Shaw J, Lichter P, Driesel AJ, Williamson R, Chamberlain S. Regional localization of the Friedreich ataxia locus to human chromosome 9q13-q21.1. *Cytogenet Cell Genet*. 1990; 53: 221-224.
45. Kostrzewa M, Klockgether T, Damian MS, Muller U. Locus heterogeneity in Friedreich ataxia. *Neurogenetics*. 1997; 1: 43-47.
46. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*. 1996; 271: 1423-1427.
47. Mayo C, Hernandez C, Cantarero D, Martínez DB, Urioste AM, Robledo BM, et al. Distribución de ataxias hereditarias dominantes y ataxia de Friedreich en la población española. *Med Clin Barc*. 2000; 115(4): 121-125.

48. Hannan AJ. TRPing Up the Genome: Tandem Repeat Polymorphisms as Dynamic Sources of Genetic Variability in Health and Disease. *Discovery Medicine*. 2010; 10(53): 314-321.
49. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Dynamic mutations as digital genetic modulators of brain development, function and dysfunction. *Bioessays*. 2007; 29(6): 525-535.
50. Cossee M, Schmitt M, Campuzano V, Reutenauer L, Moutou C, Mandel JL, et al. Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1997; 94: 7452-7457.
51. Holloway TP, Rowley SM, Delatycki MB, Sarsero JP. Detection of interruptions in the GAA trinucleotide repeat expansion in the *FXN* gene of Friedreich ataxia. *BioTechniques*. 2011; 50(3): 182–186.
52. Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Coccozza S, et al. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59: 554-560.
53. Gellera C, Castellotti B, Mariotti C, Mineri R, Seveso V, DiDonato S, et al. Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics*. 2007; 8: 289-299.
54. Pandolfo M. Mutations causing Friedreich ataxia. *Future Neurology*. 2008; 3(1): 73-85.
55. Gottesfeld JM. Small molecules affecting transcription in Friedreich ataxia. *Pharmacol Ther.* 2007; 11(2): 236-248.

56. Wells RD. Non-B conformations, mutagenesis and diseases. *Trends Biochem. Sci.* 2007; 32: 271-278.
57. Pollard ML, Bourn LR, Bidichandani SI. Repair of DNA double-strand breaks within the (GAA•TTC)<sub>n</sub> sequence results in frequent deletion of the triplet-repeat sequence. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(2): 489-500.
58. Mancuso M, Sammarco MC, Grabczyk E. Transposon Tn7 preferentially inserts into GAA•TTC triplet repeats under conditions conducive to Y•R•Y triplex formation. *PLoS One.* 2010; 5(6): e11121.
59. Wells RD. DNA triplexes and Friedreich ataxia. *The FASEB Journal.* 2008; 22(6): 1625-1634.
60. Kumari D, Usdin K. Chromatin remodeling in the noncoding repeat expansion diseases. *J Biol Chem.* 2009; 284(12): 7413-7417.
61. Ruan H, Wang YH. Friedreich's ataxia GAA.TTC duplex and GAA.GAA.TTC triplex structures exclude nucleosome assembly. *J Mol Biol.* 2008; 383(2): 292-300.
62. Puspasari N, Rowley SM, Gordon L, Lockhart PJ, Ioannou PA, Delatycki MB, et al. Long Range Regulation of Human FXN Gene Expression. *PLoS One.* 2011; 6(7): e22001.
63. Kumari D, Biacsi RE, Usdin K. Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in Friedreich ataxia cells. *J Biol Chem.* 2011; 286(6): 4209-4215.

64. Li K, Singh A, Crooks DR, Dai X, Cong Z, Pan L, et al. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PloS One*. 2010; 5(8): e12286.
65. Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, Acquaviva F, Giacchetti M, Filla A, et al. DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J Med Genet*. 2008; 45(12): 808-812.
66. Al-Mahdawi S, Mouro PR, Ismail O, Dhaval V, Lymperi S, Sandi C, et al. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Human Molecular Genetics*. 2008; 17(5): 735-746.
67. Rosales-Reynoso MA, Ochoa-Hernández AB, Barros-Núñez P. Enfermedades causadas por expansión de tripletes. *Rev Neurol*. 2009; 49: 79-87.
68. Pollard ML, Sharma R, Gómez M, Shah S, Delatycki MB, Pianese L, et al. Replication-mediated instability of the GAA triplet repeat mutation in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32(19): 5962-5971.
69. Verpoest W, Seneca S, Rademaeker M, Sermon K, Rycke M. The reproductive outcome of female patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1) undergoing PGD is not affected by the size of the expanded CTG repeat tract. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27(6): 327-333.
70. Turner C, Hilton-Jones D. The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010; 81: 358-367.
71. Stolle CA, Frackelton EC, McCallum J, Farmer JM, Tsou A, Wilson RB, et al. Novel, complex interruptions of the GAA repeat in small, expanded alleles of two

- affected siblings with late-onset Friedreich ataxia. *Mov Disord*. 2008; 23(9): 1303-1306.
72. Rindler MP, Clark MR, Pollard ML, De Biase I, Bidichandani IS. Replication in mammalian cells recapitulates the locus-specific differences in somatic instability of genomic GAA triplet-repeats. *Nucleic Acids Research*. 2006; 34(21): 6352-6361.
73. Labuda M, Labuda D, Miranda C, Poirier J, Soong BW, Barucha NE, et al. Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology*. 2000; 54: 2322–2324.
74. Kaplan S, Itzkovitz S, Shapiro E. A Universal Mechanism Ties Genotype to Phenotype in Trinucleotide Diseases. *Plos Comput Biol*. 2007; 3(11): e235.
75. De Biase I, Rasmussen A, Endres D, Al-Mahdawi S, Monticelli A, Coccozza S, et al. Progressive GAA Expansions in Dorsal Root Ganglia of Friedreich's Ataxia Patients. *Ann Neurol*. 2007; 61: 55-60.
76. Saccá F, Puorro G, Antenora A, Marsili A, Denaro A, Piro R, et al. A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PloS One*. 2011; 6(3): e17627.
77. Baralle M, Pastor T, Bussani E, Pagani F. Influence of Friedreich ataxia GAA noncoding repeat expansions on pre-mRNA processing. *Am J Hum Genet*. 2008; 83(1): 77-88.
78. Pandolfo M, Pastore A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol*. 2009; 256: 9-17.

79. Gakh O, Bedekovics T, Duncan SF, Smith DY 4<sup>th</sup>, Berkholz DS, Isaya G. Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem.* 2010; 285(49): 38486-38501.
80. Santos R, Lefevre S, Sliwa D, Seguin A, Camadro JM, Lesuisse E. Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010; 13(5): 651-690.
81. Sparaco M, Gaeta LM, Santorelli FM, Passarelli C, Tozzi G, Bertini E, et al. Friedreich's ataxia: oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *J Neurol Sci.* 2009; 287(1-2): 111-118.
82. Richardson DR, Huang MLH, Whitnall M, Becker EM, Ponka P, Rahmanto YS. The ins and outs of mitochondrial iron-loading: the metabolic defect in Friedreich's ataxia. *J Mol Med.* 2010; 88: 323-329.
83. Thierbach R, Drewes G, Fusser M, Voigt A, Kuhlow D, Blume U, et al. The Friedreich's ataxia protein frataxin modulates DNA base excision repair in prokaryotes and mammals. *Biochem J.* 2010; 432(1): 165-172.
84. Gille G, Reichmann H. Iron-dependent functions of mitochondria-relation to neurodegeneration. *J Neural Transm.* 2011; 118(3): 349-359.
85. Schmucker S, Puccio H. Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(1): R103-R110.
86. Stemmler TL, Lesuisse E, Pain D, Dancis A. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J Biol Chem.* 2010; 285(35): 26737-26743.

87. Bird AJ. Metallosensors, the ups and downs of gene regulation. *Adv Microb Physiol.* 2008; 53: 231-267.
88. Lane DJR, Richardson DR. Frataxin, a molecule of mystery: trading stability for function in its iron-binding site. *Biochem J.* 2010; 426: e1–e3.
89. Marmolino D, Manto M, Acquaviva F, Vergara P, Ravella A, Monticelli A, et al. PGC-1alpha down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS One.* 2010; 5(4): e10025.
90. Paupe V, Dassa EP, Goncalves S, Auchere F, Lonn M, Holmgren A, et al. Impaired Nrf2 Translocation Undermines the Oxidative Stress Response in Friedreich ataxia. *PLoS One.* 2009; 4: e4253.
91. Armstrong JS, Khmour O, Hecht SM. Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *FASEB J.* 2010; 24(7): 2152-2163.
92. Haugen AC, Di Prospero NA, Parker JS, Fannin RD, Chou J, Meyer JN, et al. Altered Gene Expression and DNA Damage in Peripheral Blood Cells from Friedreich's Ataxia Patients: Cellular Model of Pathology. *PLoS Genet.* 2010; 6(1): e1000812.
93. Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res.* 2009; 674(1-2): 73-84.
94. Cossee M, Puccio H, Gansmuller A, Konnikova H, Dierich A, LeMeur M, et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 1219-1226.

95. Espinós-Armero C, González-Cabo P, Palau-Martínez F. Autosomal recessive cerebellar ataxias. Their classification, genetic features and pathophysiology. *Rev Neurol*. 2005; 41(7): 409-422.
96. Koeppen AH, Michael SC, Knutson MD, Haile DJ, Qian J, Levi S, et al. The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol*. 2007; 114: 163-173.
97. Koeppen AH, Morral JA, Davis AN, Qian J, Petrocine SV, Knutson MD, et al. The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol*. 2009; 118: 763-776.
98. Palau F, De Michele G, Vilchez JJ, Pandolfo M, Monros E, Coccozza S, et al. Early-onset ataxia with cardiomyopathy and retained tendon reflexes maps to the Friedreich's ataxia locus on chromosome 9q. *Ann Neurol*. 1995; 37: 359-362.
99. Hanna MG, Davis MB, Sweeney MG, Noursadeghi M, Ellis CJ, Elliot P, et al. Generalized chorea in two patients harboring the Friedreich's ataxia gene trinucleotide repeat expansion. *Mov Disord*. 1998; 13: 3339-3340.
100. Clark RM, Dalgliesh GL, Endres D, Gomez M, Taylor J, Bidichandani SI. Expansion of GAA triplet repeats in the human genome: unique origin of the FRDA mutation at the center of an Alu. *Genomics*. 2004; 83(3): 373-383.
101. Colombo R, Carobene A. Age of the intronic GAA triplet repeat expansion mutation in Friedreich ataxia. *Hum Genet*. 2000; 106: 455-458.
102. Marmolino D, Acquaviva F. Friedreich ataxia: from the (GAA)<sub>n</sub> repeat mediated silencing to new promising molecules for therapy. *Cerebellum*. 2009; 8(3): 245-259.

103. Sandi C, Pinto RM, Al-Mahdawi S, Ezzatizadeh V, Barnes G, Jones S, et al. Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol Dis.* 2011; 42(3): 496-505.
104. Saccá F, Piro R, De Michelle G, Acquaviva F, Antenora A, Carlomagno G, et al. Epoetin alfa increases frataxin production in Friedreich's ataxia without affecting hematocrit. *Mov Disord.* 2011; 26(4): 739-742.
105. Bennett CL, Silver SM, Djulbegovic B, Samaras AT, Blau CA, Gleason KJ, et al. Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA.* 2008; 299: 914-924.
106. Pollock C, Johnson DW, Hörl WH, Rossert J, Casadevall N, Schellekens H, et al. Pure red cell aplasia induced by erythropoiesis-stimulating agents. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 193-199.
107. Aapro M, Leonard RC, Barnadas A, Marangolo M, Untch M, Malamos N, et al. Effect of once-weekly epoetin beta on survival in patients with metastatic breast cancer receiving anthracycline-and/or taxane-based chemotherapy: results of Breast Cancer-Anemia and the Value of Erythropoietin (BRAVE) study. *J Clin Oncol.* 2008; 26(4): 592-598.
108. Thomas G, Ali S, Hoebbers FJ, Darcy KM, Rodgers WH, Patel M, et al. Phase III trial to evaluate the efficacy of maintaining haemoglobin levels above 12.0 g/dL with erythropoietin vs above 10.0 g/dL without erythropoietin in anemic patients

- receiving concurrent radiation and cisplatin for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 108(2): 317-325.
109. Velasco-Sánchez D, Aracil A, Montero R, Mas A, Jimenez L, O'Callaghan M, et al. Combined therapy with idebenone and deferiprone in patients with Friedreich's ataxia. *Cerebellum.* 2011; 10(1): 1-8.
110. Gonçalves S, Paupe V, Dassa EP, Rustin P. Deferiprone targets aconitase: Implication for Friedreich's ataxia. *BMC Neurology.* 2008; 8: 1-4.
111. Kakhlon O, Breuer W, Munnich A, Cabantchik Z. Iron redistribution as a therapeutic strategy for treating diseases of localized iron accumulation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88: 187-196.
112. Cooper JM, Korlipara LV, Hart PE, Bradley JL, Schapira AH. Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy. *European Journal of Neurology.* 2008; 15: 1371-1379.
113. Myers L, Farmer JM, Wilson RB, Friedman L, Perlman SL, Subramony SH, et al. Antioxidant use in Friedreich ataxia. *J Neurol Sci.* 2008; 15(1-2): 174-176.
114. Quinzii CM, López LC, Naini A, DiMauro S, Hirano M. Human CoQ10 deficiencies. *BioFactors.* 2008; 32: 113-118.
115. Chapela SP, Burgos HI, Salazar AI, Nievas I, Krieger N, Stella CA. Biochemical study of idebenone effect on mitochondrial metabolism of yeast. *Cell Biol Internat.* 2008; 32(1): 146-150.
116. Lynch DR, Perlman SL, Meier T. A Phase 3, Double-blind, Placebo-Controlled Trial of Idebenone in Friedreich Ataxia. *Arch Neurol.* 2010; 67(8): 941-947.

117. Doughan AK, Dikalov SI. Mitochondrial redox cycling of mitochinone leads to superoxide production and cellular apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(11): 1825-1836.
118. Lim F, Palomo GM, Mauritz C, Gimenez-Cassina A, Illana B, Wandosell F, et al. Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector. *Mol Ther*. 2007; 15: 1072-1078.
119. Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, Delatycki MB, Michalska A, Leung J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev*. 2011; 7(3): 703-713.
120. Sánchez CG. Caracterización clínico-epidemiológica de enfermos y descendientes con riesgo de ataxia espinocerebelosa tipo 2 en Cuba [Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas]. Holguín: Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello", Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba; 2010.
121. Miembros de la Clínica Mayo, Departamento de Neurología. Exploración neurológica. En: Wiebers DO, Dale AJD, Kokmen E, Swanson JW, editores. *Clínica Mayo: Exploración clínica en Neurología*. 7ma ed. Barcelona: Editorial Médica JIMS; 1999. p. 1-408.
122. Schmitz-Hubsch T, Tezenas du Montcel S, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*. 2006; 66: 1717-1720.
123. Miembros de la Clínica Mayo, Departamento de Neurología. Neurooftalmología. Pares craneales II, III, IV y VI. En: Wiebers DO, Dale AJD, Kokmen E, Swanson

- JW, editores. Clínica Mayo: Exploración clínica en Neurología. 7ma ed. Barcelona: Editorial Médica JIMS; 1999. p. 123-180.
124. Llanio NR, Perdomo GG, Arús SE, Fernández NA, Fernández SJA, Matarama PM, et al. Exploración del sistema circulatorio. Región precordial. En: Llanio NR, Perdomo GG, editores. Propedéutica clínica y semiología médica. Tomo 1. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2003. p. 120-132.
125. Villanueva-Haba VE, Vílchez JJ, Sánchez MG, Bataller L, Palau F. Estudio de neuroimagen con análisis morfométrico de las ataxias hereditarias e idiopáticas. Rev Neurol. 2001; 16: 105-111.
126. Velázquez PL, Sánchez CG, Canales ON, Rodríguez LG, Rodríguez DJ, Almaguer MLE, et al. Electrophysiological features in patients and presymptomatic relatives with spinocerebellar ataxia type 2. Journal of Neurological Sciences. 2007; 263: 158-164.
127. Pérez PO. Electrocardiograma Elementos prácticos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2011. p. 10-15.
128. Procedimientos Normalizados de Operación. Laboratorio de Neurobiología Molecular del CIRAH. 2010. p. 37.
129. Sambrook J, MacCallum P, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
130. Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, et al. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. Nature Genetics. 1996; 14: 269-276.

131. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, et al. CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics*. 1994; 8: 221-228.
132. Dorschner MO, Barden D, Stephens K. Diagnosis of Five Spinocerebellar Ataxia Disorders by Multiplex Amplification and Capillary Electrophoresis. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2002; 4(2): 108-113.
133. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genetics*. 1993; 4: 398-403.
134. Cruz-Mariño T, Álvarez CJ, Aguilera RR, Velázquez PL. Resonancia Magnética Nuclear de cráneo en primeras familias cubanas diagnosticadas con ataxia de Friedreich. *Revista de Ciencias de Holguín*. 2011 (1). ISSN 1027-2127 (Disponible en URL: <http://www.ciencias.holguin.cu/2011/Febrero/articulos/htm>).
135. Anuario Estadístico de Cuba 2009. Disponible en <http://www.one.cu/aec2009.htm>. (Última visita Agosto 15 de 2011).
136. Murphy EA, Mutalik GS. The application of Bayesian methods in genetic counseling. *Human Hered*. 1969; 19: 126-151.
137. Bernard G, Shevell M. The wobbly child: an approach to inherited ataxias. *Semin Pediatr Neurol*. 2008; 15(4): 194-208.
138. Finsterer J. Ataxias with Autosomal, X-Chromosomal or Maternal Inheritance. *Can. J. Neurol. Sci*. 2009; 36: 409-428.

139. Degardin A, Dobbelaere D, Vuillaume I, Defoort-Dhellemmes S, Hurtevent JF, Sablonniere B, et al. Spinocerebellar Ataxia: A Rational Approach to Aetiological Diagnosis. *Cerebellum*. 2011; 1-11.
140. Chakravarty A, Mukherjee SC. Primary degenerative cerebellar ataxia in ethnic Bengalees in West Bengal. *Neurology India*. 2003; 51 (2): 227-234.
141. Schols L, Szymanski S, Peters S, Przuntek H, Epplen JT, Hardt C, et al. Genetic background of apparently idiopathic sporadic cerebellar ataxia. *Hum Genet*. 2000; 107: 132-137.
142. Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, et al. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics*. 2010; 11 (1): 1-12.
143. Rasmussen A, Gómez M, Alonso E, Bidichandani SI. Clinical heterogeneity of recessive ataxia in the Mexican population. *Mexico Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2006; 77: 1370-1372.
144. Prieto JC, Pedraza OL, Gómez M, Durán C. Análisis molecular de la ataxia de Friedreich en Colombia. *Acta Neurol Colombia*. 2004; 20(1): 7-12.
145. Hirayama K, Takayanagi T, Nakamura R, Yanagisawa N, Hattori T, Kita K, et al. Spinocerebellar degenerations in Japan: a nationwide epidemiological and clinical study. *Acta Neurol Scand*. 1994; 89 (153): 1-22.
146. Koht J, Tallaksen CM. Cerebellar ataxia in the eastern and southern parts of Norway. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2007; 187: 76-79.

147. Juvonen V, Kulmala SM, Ignatius J, Penttinen M, Savontaus ML. Dissecting the epidemiology of a trinucleotide repeat disease-example of FRDA in Finland. *Hum Genet.* 2002; 110: 36-40.
148. Guanche J. Componentes étnicos de la nación cubana. Havana: Fundación Fernando Ortiz. 1997.
149. Laffita MJ, Velázquez PL, Santos FN, Cruz MT, González ZY, Vázquez MY, et al. Unexpanded and intermediate CAG polymorphisms at the SCA2 locus (ATXN2) in the Cuban population: evidence about the origin of expanded SCA2 alleles. *European Journal of Human Genetics.* 2012; 20: 41-49.
150. Tranchant C, Anheim M. Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Presse Med.* 2009; 38 (12): 1852-1859.
151. Hamamy H, Antonarakis SE, Cavalli-Sforza LL, Temtamy S, Romeo G, Kate LP, et al. Consanguineous marriages, pearls and perils: Geneva International Consanguinity Workshop Report. *Genet Med.* 2011; 13(9): 841-847.
152. Chattopadhyay B, Gupta S, Gangopadhyay PK, Das SK, Roy T, Mukherjee SC, et al. Molecular Analysis of GAA Repeats and Four Linked Bi-allelic Markers in and Around the Frataxin Gene in Patients and Normal Populations from India. *Annals of Human Genetics.* 2004; 68: 189-195.
153. Monticelli A, Giacchetti M, De Biase I, Pianese L, Turano M, Pandolfo M, et al. New clues on the origin of the Friedreich ataxia expanded alleles from the analysis of new polymorphisms closely linked to the mutation. *Hum Genet.* 2004; 114(5): 458-463.

154. Bertan YM, Filiz KA, Kasap H, Irfan GA, Sarica Y, Suleymanova D, et al. GAA Repeat Polymorphism in Turkish Friedreich's ataxia patients. *Intern J Neuroscience*. 2006; 116: 565-574.
155. Magañas JJ, Cortés-Reynosa P, Escobar-Cedillo R, Gómez R, Leyva-García N, Cisneros B. Distribution of CTG repeats at the DMPK gene in myotonic dystrophy patients and healthy individuals from the Mexican population. *Mol Biol Rep*. 2010; 38(2): 1341-1346.
156. Singh I, Faruq M, Mukherjee O, Jain S, Srivastav MV, Behari M, et al. North and South Indian populations share a common ancestral origin of Friedreich's ataxia but vary in age of GAA repeat expansion. *Ann Hum Genet*. 2010; 74(3): 202-210.
157. Cruz-Mariño T, González-Zaldívar Y, Laffita-Mesa JM, Almaguer-Mederos LE, Rodríguez-Aguilera R, Gotay-Almaguer D, et al. Low predisposition to instability of the Friedreich ataxia gene in Cuban population. *Clin Genet*. 2010; 77: 598-600.
158. White VB, Leib JR, Farmer JM, Biesecker BB. Exploration of transitional life events in individuals with Friedreich ataxia: Implications for genetic counseling. *Behav Brain Funct*. 2010; 6: 65.
159. Moffett A, Ross LF. A pilot study to determine whether health care professionals perceive stigma in heterozygote carrier identification and disclosure decisions. *Am J Med Genet A*. 2011; 155(8): 1897-1905.
160. Cruz-Mariño T, Reynaldo AR, Jorge CH, Laffita MJ, González ZY, Rodríguez AR, et al. Ethical Dilemmas in Genetic Testing: Examples from the Cuban Program

- for Predictive Diagnosis of Hereditary Ataxias. *Journal of Genetic Counseling*. 2011; 20(3): 241-248.
161. Ditch S, Sammarco MC, Banerjee A, Grabczyk E. Progressive GAA·TTC Repeat Expansion in Human Cell Lines. *PLoS Genet*. 2009; 5(10): e1000704.
162. Heidari MM, Houshmand M, Hosseinkhani S, Nafissi S, Scheiber-Mojdehkar B, Khatami M. Association between trinucleotide CAG repeats of the DNA polymerase gene (POLG) with age of onset of Iranian Friedreich's ataxia patients. *Neurol Sci*. 2008; 29: 489-493.
163. Heidari MM, Houshmand M, Hosseinkhani S, Nafissi S, Scheiber-Mojdehkar B, Khatami M. A novel mitochondrial heteroplasmic C13806A point mutation associated with Iranian Friedreich's ataxia. *Cell Mol Neurobiol*. 2009; 29(2): 225-233.
164. Cruz-Mariño T, González ZY, Laffita MJ, Mederos AL, Aguilera RR, Almaguer GD, et al. Uncommon Features in Cuban Patients Affected by Friedreich Ataxia. *Neuroscience Letters*. 2010; 472: 85-89.
165. Loesch DZ, Hay DA. Clinical features and reproductive patterns in fragile X female heterozygotes. *J. Med. Genet*. 1988; 25: 407-414.
166. Rudnik-Schöneborn S, Schneider-Gold C, Raabe U, Kress W, Zerres K, Schoser BGH. Outcome and effect of pregnancy in myotonic dystrophy type 2. *Neurology*. 2006; 66: 579-580.
167. Almaguer ML, Falcon NS, Almira YR, Zaldivar YG, Almarales CD, Góngora EM, et al. Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. *Clin Genet*. 2010; 78: 169-174.

168. La Pean A, Jeffries N, Grow C, Ravina B, Di Prospero NA. Predictors of progression in patients with Friedreich ataxia. *Mov Disord.* 2008; 23(14): 2026-2032.
169. Tsou AY, Paulsen EK, Lagedrost SJ, Perlman SL, Mathews KD, Wilmot GR, et al. Mortality in Friedreich ataxia. *J Neurol Sci.* 2011; 307(1-2): 46-49.
170. Hanley A, Corrigan R, Mohammad S, MacMahon B. Friedreich's ataxia cardiomyopathy: case based discussion and management issues. *Ir Med J.* 2010; 103(4): 117-118.
171. Ropper AH, Samuels MA, editores. Cardinal manifestations of neurologic disease: Incoordination and other disorders of cerebellar function. En: Adams and Victor's Principles of Neurology. 9 ed [CD-ROM]. USA: McGraw-Hill; 2009.
172. Hocking DR, Fielding J, Corben LA, Cremer PD, Millist L, White OB, et al. Ocular Motor Fixation Deficits in Friedreich Ataxia. *Cerebellum.* 2010; 411-418.
173. Fielding J, Corben L, Cremer P, Millist L, White O, Delatycki M. Disruption to higher order processes in Friedreich ataxia. *Neuropsychology.* 2010; 48(1): 235-242.
174. Fahey MC, Cremer PD, Aw ST, Millist L, Todd MJ, White OB, et al. Vestibular, saccadic and fixation abnormalities in genetically confirmed Friedreich ataxia. *Brain.* 2008; 131: 1035-1045.
175. Iltis I, Hutter D, Bushara KO, Clark HB, Gross M, Eberly LE, et al. (1)H MR spectroscopy in Friedreich's ataxia and ataxia with oculomotor apraxia type 2. *Brain Research.* 2010; 1358: 200-210.

176. Paulson HL. The spinocerebellar ataxias. *J Neuroophthalmol.* 2009; 29(3): 227-237.
177. Fortuna F, Barboni P, Liguori R, Valentino ML, Savini G, Gellera C, et al. Visual system involvement in patients with Friedreich's ataxia. *Brain.* 2009; 132: 116-123.
178. Porter N, Downes SM, Fratter C, Anslow P, Németh AH. Catastrophic Visual Loss in a Patient With Friedreich Ataxia. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 273-274.
179. Diehl B, Lee MS, Reid JR, Nielsen CD, Natowicz MR. Atypical, perhaps under-recognized? An unusual phenotype of Friedreich ataxia. *Neurogenetics.* 2010; 11: 261-265.
180. du Montcel ST, Charles P, Ribai P, Goizet C, Le Bayon A, Labauge P, et al. Composite cerebellar functional severity score: validation of a quantitative score of cerebellar impairment. *Brain.* 2008; 131: 1352-1361.
181. Kieling C, Rieder CRM, Silva ACF, Saute JAM, Cecchin CR, Monte TL, et al. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Europ Journal of Neurology.* 2008; 15: 371-376.
182. Schmitz-Hubsch T, Coudert M, Bauer P, Giunti P, Globas C, Baliko L, et al. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6. Disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology.* 2008; 71: 982-989.
183. Schmitz-Hubsch T, Giunti P, Stephenson DA, Globas C, Baliko L, Sacca F, et al. SCA functional index: a useful compound performance measure for spinocerebellar ataxia. *Neurology.* 2008; 71: 486-492.

184. Schmahmann JD, Gardner R, MacMore J, Vangel MG. Development of a Brief Ataxia Rating Scale (BARS) based on a modified form of the ICARS. *Mov Disord.* 2009; 24(12): 1820-1828.
185. Croarkin E, Maring J, Pfalzer L, Harris-Love M, Siegel K, DiProspero N. Characterizing gait, locomotor status, and disease severity in children and adolescents with Friedreich ataxia. *J Neurol Phys Ther.* 2009; 33(3): 144-149.
186. Sival AD, Pouwels ME, van Brederode A, Maurits NM, Verschuuren-Bemelmans CC, Brunt E, et al. In children with Friedreich ataxia, muscle and ataxia parameters are Associated. *Developmental Medicine & Child Neurology.* 2011; 53: 529–534.
187. Burk K, Malzig U, Wolf S, Heck S, Dimitriadis K, Schmitz-Hubsch T, et al. Comparison of Three Clinical Rating Scales In Friedreich Ataxia (FRDA). *Mov Disord.* 2009; 24(12): 1779-1784.
188. Friedman LS, Farmer JM, Perlman S, Wilmot G, Gomez CM, Bushara KO, et al. Measuring the rate of progression in Friedreich ataxia: implications for clinical trial design. *Mov Disord.* 2010; 25(4): 426-432.
189. Hensinger RN. Congenital Scoliosis. Etiology and Associations. *Spine.* 2009; 34(17): 1745-1750.
190. Mahaudens P, Detrembleur C, Mousny M, Banse X. Gait in adolescent idiopathic scoliosis: energy cost analysis. *Eur Spine J.* 2009; 18: 1160-1168.
191. Buttermann GR, Mullin WJ. Pain and disability correlated with disc degeneration via magnetic resonance imaging in scoliosis patients. *Eur Spine J.* 2008; 17: 240-249.

192. Milbrandt TA, Kunes JR, Karol LA. Friedreich's ataxia and scoliosis: the experience at two institutions. *J Pediatr Orthop*. 2008; 28(2): 234-238.
193. Cruz-Mariño T, Portelles CA, Áreas ZW, Velázquez PL. Enfermedad cardiovascular en pacientes cubanos afectados por Ataxia de Friedreich. *Revista de Ciencias de Holguín*. 2010 (4). ISSN 1027-2127 (Disponible en URL: <http://www.ciencias.holguin.cu/2011/Enero/articulos/htm>).
194. Asaad N, El-Menyar A, Al Suwaidi J. Recurrent ventricular tachycardia in patient with Friedreich's ataxia in the absence of clinical myocardial disease. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2010; 33(1): 109-112.
195. Mottram PM, Delatycki MB, Donelan L, Gelman JS, Corben L, Peverill RE. Early Changes in Left Ventricular Long-Axis Function in Friedreich Ataxia: Relation with the FXN Gene Mutation and Cardiac Structural Change. *J Am Soc Echocardiogr*. 2011; 24(7): 782-789.
196. Gucev Z, Tasic V, Jancevska A, Popjordanova N, Koceva S, Kuturec M, et al. Friedreich ataxia (FA) associated with Diabetes Mellitus type 1 and hypertrophic cardiomyopathy. *Bosnian Journal Basic Medical Sciences*. 2009; 9(2): 107-110.
197. Michael S, Petrocine S, Qian J, Lamarche JB, Garrick M, Koeppen A, et al. Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum*. 2006; 5: 257-267.
198. Raman SV, Phatak K, Hoyle JC, Pennell ML, McCarthy B, Tran T, et al. Impaired myocardial perfusion reserve and fibrosis in Friedreich ataxia: a mitochondrial cardiomyopathy with metabolic syndrome. *Eur Heart J*. 2011; 32(5): 561-567.

199. Raman SV, Dickerson JA, Al-Dahhak R. Myocardial ischemia in the absence of epicardial coronary artery disease in Friedreich's ataxia. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2008; 10: 15.
200. Quercia N, Somers GR, Halliday W, Kantor PF, Banwell B, Yoon G. Friedreich ataxia presenting as sudden cardiac death in childhood: clinical, genetic and pathological correlation, with implications for genetic testing and counselling. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20(5): 340-342.
201. Sharma AK, Kiyokawa M, Kim ET, Lee DT, Kasuya R. Acute myocardial infarction and Friedreich's ataxia. *Hawaii Med J*. 2002; 61: 199-201.
202. Davis TME, Fortun P, Mulder J, Davis WA, Bruce DG. Silent myocardial infarction and its prognosis in a community-based cohort of Type 2 diabetic patients: the Fremantle Diabetes study. *Diabetologia*. 2004; 47: 395-399.
203. Cervantes-Arriaga A, Rodríguez-Violante M, Villar-Velarde A, Vargas-Cañas S. Two case studies of hypertrophic cardiomyopathy in Friedreich's ataxia. *Gac Med Mex*. 2009; 145(4): 343-346.
204. Rajagopalan B, Francis JM, Cooke F, Korlipara LV, Blamire AM, Schapira AH, et al. Analysis of the factors influencing the cardiac phenotype in Friedreich's ataxia. *Mov Disord*. 2010; 25(7): 846-852.
205. Kipps A, Alexander M, Colan SD, Gauvreau K, Smoot L, Crawford L, et al. The Longitudinal Course of Cardiomyopathy in Friedreich's Ataxia During Childhood. *Pediatr Cardiol*. 2009; 30: 306-310.

206. Lindgren CM, Mahtani MM, Widen E, McCarthy MI, Daly MJ, Kirby A, et al. Genome wide search for type 2 diabetes mellitus susceptibility loci in Finnish families: the Botnia study. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70: 509-516.
207. Hebinck J, Hardtt C, Schols L, Vorgerd M, Briedigkeit L, Kahn CR, et al. Heterozygous expansion of the GAA tract of the X25/Frataxin gene is associated with insulin resistance in humans. *Diabetes.* 2000; 49: 1604-1607.
208. Della Nave R, Ginestroni A, Tessa C, Salvatore E, Bartolomei I, Salvi F, et al. Brain white matter tracts degeneration in Friedreich ataxia. An in vivo MRI study using tract-based spatial statistics and voxel-based morphometry. *Neuroimage.* 2008; 40: 19-25.
209. Della Nave R, Ginestroni A, Giannelli M, Tessa C, Salvatore E, Salvi F, et al. Brain structural damage in Friedreich's ataxia. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.* 2008; 79: 82-85.
210. Pagani E, Ginestroni A, Della Nave R, Agosta F, Salvi F, De Michele G, et al. Assessment of brain white matter fiber bundle atrophy in patients with Friedreich ataxia. *Radiology.* 2010; 255(3): 882-889.
211. Rizzo G, Tonon C, Valentino ML, Manners D, Fortuna F, Gellera C, et al. Brain diffusion-weighted imaging in Friedreich's ataxia. *Mov Disord.* 2011; 26(4): 705-712.
212. Franca MC Jr, D'Abreu A, Yasuda CL, Cardoso LB, Santos SM, Nucci A, et al. A combined voxel-based morphometry and <sup>1</sup>H-MRS study in patients with Friedreich ataxia. *J Neurol.* 2009; 256: 1114-1120.

213. Santiago-Pérez S, Pérez-Conde MC, Ugalde-Canitrot A, López-Pajares MR. Estudio neurofisiológico de las alteraciones del sistema nervioso central y periférico en la ataxia de Friedreich. *Rev Neurol.* 2007; 44: 193-197.
214. Morral Ja, Davis AN, Qian J, Gelman BB, Koeppen AH. Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 97-108.
215. Sival DA, du Marchie-Sarvaas GJ, Brouwer OF, Uges DR, Verschuuren-Bemelmans CC, Maurits NM, et al. Neurophysiological evaluation in children with Friedreich's ataxia. *Early Hum Dev.* 2009; 85(10): 647-651.
216. De Pablos C, Berciano J, Calleja J. Brain stem auditory evoked potentials and blink reflex in friedreich's ataxia. *J Neurol.* 1991; 238: 212-216.
217. Rance G, Fava R, Baldock H, Chong A, Barker E, Corben L, et al. Speech perception ability in individuals with Friedreich ataxia. *Brain.* 2008; 131: 2002-2012.
218. Rance G, Corben L, Barker E, Carew P, Chisari D, Rogers M, et al. Auditory Perception in Individuals with Friedreich's Ataxia. *Audiol Neurotol.* 2010; 15: 229-240.
219. Kostic SV, Drulovic B, Todorovic D. Visual evoked potentials in families with Friedreich's ataxia. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 1988; 28: 89-92.

# **ANEXOS**

**Anexo 1. Mutaciones puntuales del gen FRDA descritas en sujetos heterocigotos compuestos<sup>1</sup>**

<b>No</b>	<b>Número de familias</b>	<b>Mutación</b>	<b>Sitio</b>	<b>Efecto</b>
1	1	1A→C	Exón 1	Pérdida de sentido
2	1	2T→C	Exón 1	Pérdida de sentido
3	1	2delT	Exón 1	Pérdida de sentido
4	3	3G→T	Exón 1	Pérdida de sentido
5	1	3G→A	Exón 1	Pérdida de sentido
6	1	11-12 delTC	Exón 1	Marco de lectura
7	1	100delG	Exón 1	Marco de lectura
8	1	104delC	Exón 1	Marco de lectura
9	1	118C→T	Exón 1	Pérdida de sentido
10	1	118delC	Exón 1	Marco de lectura
11	5	157delC	Exón 1	Marco de lectura
12	1	157insC	Exón 1	Marco de lectura
13	1	IVS1+5 G→C	Intrón 1	Empalme aberrante
14	1	202_205 delGTCAinsTTG	Exón 2	Marco de lectura
15	1	296_297insT	Exón 3	Marco de lectura
16	1	317T→G	Exón 3	Sin sentido
17	1	317T→C	Exón 3	Pérdida de sentido
18	1	317delT	Exón 3	Sin sentido
19	1	340_352del13	Exón 3	Marco de lectura
20	1	354C→G	Exón 3	Sin sentido
21	1	364G→T	Exón 3	Pérdida de sentido
22	1	381_384delTGGG+IVS3+1_+9delGTACCTCTT	Exón 3- Intrón 3	Empalme aberrante
23	1	IVS3+1G→A	Intrón 3	Empalme aberrante
24	1	IVS3-2A→G	Intrón 3	Empalme aberrante

25	5	389G→T	Exón 4	Pérdida de sentido
26	1	438C→G	Exón 4	Pérdida de sentido
27	4	460A→T	Exón 4	Pérdida de sentido
28	1	464T→C	Exón 4	Pérdida de sentido
29	1	465G→A	Exón 4	Sin sentido
30	1	467T→C	Exón 4	Pérdida de sentido
31	1	IVS4+2T→G	Intrón 4	Empalme aberrante
32	1	IVS4+3delA	Intrón 4	Empalme aberrante
33	2	493C→T	Exón 5a	Pérdida de sentido
34	1	494G→C	Exón 5a	Pérdida de sentido
35	5	517T→G	Exón 5a	Pérdida de sentido
36	1	544C→T	Exón 5a	Pérdida de sentido
37	1	545T→A	Exón 5a	Pérdida de sentido
38	1	548A→G	Exón 5a	Pérdida de sentido
39	1	557T→G	Exón 5a	Pérdida de sentido
40	1	593T→G	Exón 5a	Pérdida de sentido
41	1	120032_122808del	Exón 5a	Delección del exón 5a

---

<sup>1</sup>Gellera C, Castellotti B, Mariotti C, Mineri R, Seveso V, DiDonato S, et al. Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics*. 2007; 8: 289–299.

## **Anexo 2. Criterios de Harding para el diagnóstico clínico de la ataxia de Friedreich<sup>2</sup>**

### **Criterios de Harding de 1984.**

*Durante los cinco primeros años:*

Criterios  
esenciales

- 1-Edad de comienzo antes de los 25 años.
- 2-Ataxia progresiva de extremidades y de la marcha.
- 3-Ausencia de reflejos en extremidades inferiores.
- 4-Respuesta plantar extensora.
- 5- Velocidad de conducción nerviosa motora periférica mayor de 40m/s en extremidades superiores.

*Después de los primeros cinco años:*

Criterios  
adicionales

-Todo lo anterior más disartria.

- 1-Escoliosis.
- 2-Debilidad piramidal en extremidades inferiores.
- 3-Ausencia de reflejos en extremidades superiores.
- 4-Pérdida de sentido de posición y vibración en extremidades inferiores.
- 5-Anomalías en el electrocardiograma.

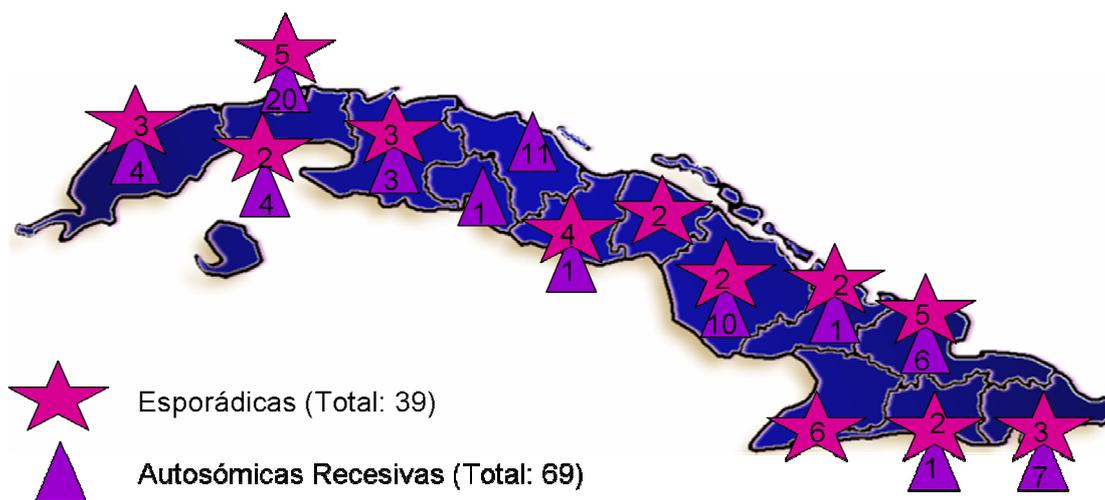
Otros

- 1-Nistagmo.
- 2-Atrofia óptica.
- 3-Sordera.
- 4-Atrofia muscular.
- 5-Pie cavo.
- 6-Diabetes.

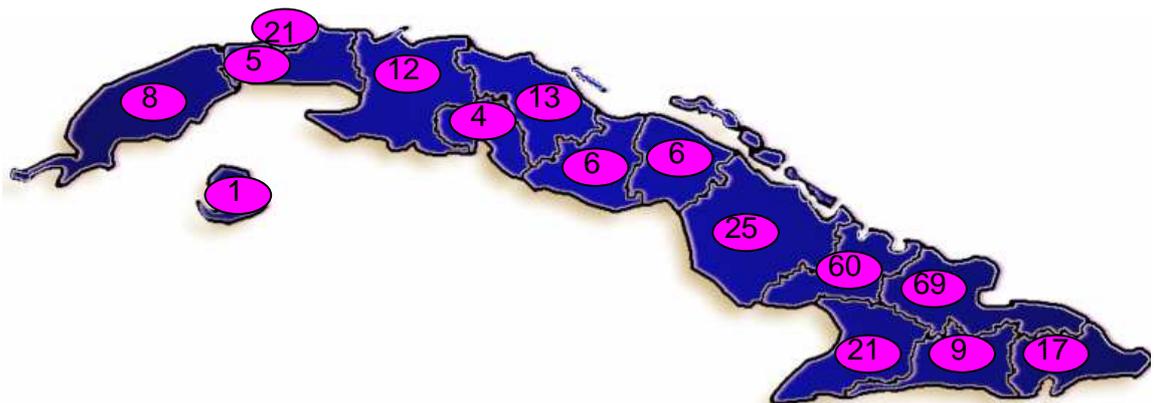
---

<sup>2</sup>Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders. Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne and New York 1984.

**Anexo 3. Sujetos afectados por ataxias recesivas o esporádicas en Cuba según origen ancestral**



**Anexo 4. Sujetos saludables de la población cubana estudiados según origen ancestral**



**Anexo 5. Historia clínica-genética**

No. H.C. \_\_\_\_\_

Hospital: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Centro y especialidad que remite: \_\_\_\_\_

Área de salud: \_\_\_\_\_ Natural de: \_\_\_\_\_

Motivo de consulta: \_\_\_\_\_

PADRE (nombre, edad, escolaridad y ocupación) \_\_\_\_\_

MADRE (nombre, edad, escolaridad y ocupación) \_\_\_\_\_

**HISTORIA REPRODUCTIVA**

EMBARAZO	FECHA	PRODUCTO
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

**HISTORIA DEL EMBARAZO DEL PROPOSITUS**

Edad gestional al parto: \_\_\_\_\_ Amenaza de aborto (especificar): \_\_\_\_\_

Movimientos fetales (ausentes, fuertes, débiles): \_\_\_\_\_

Aclarar trimestre, tiempo, tratamiento y dosis en relación a:

Infecciones: \_\_\_\_\_

Drogas (medicamentos, alcohol, cigarro, otras): \_\_\_\_\_

Radiaciones: \_\_\_\_\_

Enfermedades maternas: \_\_\_\_\_

Historia de infertilidad: \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_

ESTUDIOS PRENATALES (tipos, edad gestacional, resultados): \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES FAMILIARES (abortos, infertilidad, mortinatos, malformados, retraso, epilepsia u otras enfermedades genéticas) \_\_\_\_\_

ÁRBOL GENEALÓGICO (dibujar al dorso de la hoja, no menos de tres generaciones).

HISTORIA PERINATAL Y DESARROLLO PSICOMOTOR:

Parto: \_\_\_\_\_

ANOTACIONES DE NEONATOLOGÍA: \_\_\_\_\_

Succión (intolerancia a la leche): \_\_\_\_\_

Cianosis: \_\_\_\_\_ Íctero: \_\_\_\_\_ Convulsiones: \_\_\_\_\_

Otros (incluye hipotonía, ausencia de reflejos, hipertonía): \_\_\_\_\_

Sostuvo la cabeza: \_\_\_\_\_ Se sentó: \_\_\_\_\_ Se paró: \_\_\_\_\_ Caminó: \_\_\_\_\_

Control de esfínteres: \_\_\_\_\_ Lenguaje: \_\_\_\_\_

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD (Al dorso de la hoja)

EXAMEN FÍSICO:

Talla: \_\_\_\_\_ Brazada: \_\_\_\_\_ Seg. Inferior: \_\_\_\_\_ C.C \_\_\_\_\_

Percentiles ( aclarar tablas utilizadas): \_\_\_\_\_

ORDEN DEL EXAMEN FÍSICO:

CABEZA (cráneo, cara, mentón, orejas, ojos, nariz, boca, cavidad oral):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

CUELLO: \_\_\_\_\_

TÓRAX: \_\_\_\_\_

ABDOMEN: \_\_\_\_\_

EXTREMIDADES ( articulaciones, manos y pies): \_\_\_\_\_

COLUMNA VERTEBRAL : \_\_\_\_\_

PIEL: \_\_\_\_\_

GENITALES Y DESARROLLO SEXUAL: \_\_\_\_\_

NEUROMUSCULAR ( reflejos, hipotonía, hipertonía, hipertrofia, hipotrofia, atrofia, sensibilidad al dolor, convulsiones, ceguera, sordera, otros) \_\_\_\_\_

RETRASO MENTAL: \_\_\_\_\_

RETRASO DEL LENGUAJE Y CARACTERÍSTICAS DE LA VOZ: \_\_\_\_\_

TRASTORNOS DE LA CONDUCTA: \_\_\_\_\_

IMPRESIÓN DIAGNÓSTICA: \_\_\_\_\_

EXÁMENES QUE SE INDICAN E INTERCONSULTAS: \_\_\_\_\_

ORIENTACIONES: \_\_\_\_\_

DISCUSIÓN DIAGNÓSTICA ( al dorso de la hoja):

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO: \_\_\_\_\_

ASESORAMIENTO GENÉTICO Y EVOLUCIONES: \_\_\_\_\_

## **Anexo 6. Parámetros utilizados en la Clínica Mayo para el examen neurológico<sup>3</sup>**

### **1-Examen físico general:**

-Facies -Piel -Mucosas -SOMA -Nervios Periféricos

### **2-Función Mental:**

-Atención

-Memoria

-Lenguaje

-Praxia

-Función visuoespacial y percepción

### **3-Lenguaje y articulación motora del habla:**

-Comprensión

-Expresión oral

-Expresión escrita

-Lenguaje extraverbal

-Disartria

-Apraxia del habla

-Afasia

-Otros

### **4- Pares craneales:**

-I par, II par, III, IV y VI pares, V par, VI par, VII par, VIII par, IX par, X par, XI par y XII par.

### **5- Función motora en miembros superiores e inferiores: integración central.**

-Tono muscular (motilidad estática)

- Coordinación dinámica (taxia dinámica)
- Velocidad de movimiento alternado
- Movimientos involuntarios anormales-hipercinesias (motilidad activa involuntaria)
- Actitud acostado, sentado y de pie
- Marcha

#### **6- Función motora: músculo.**

- Trastornos del tamaño
- Movimientos musculares intrínsecos
- Respuesta a la percusión
- Palpación del músculo
- Fuerza muscular (motilidad activa voluntaria)

#### **7- Reflectividad:**

- Reflejos de distensión muscular
- Reflejos superficiales
- Reflejos patológicos.

#### **8- Sensibilidad:**

- Sensibilidad superficial, profunda y combinada.

---

<sup>3</sup>Miembros de la Clínica Mayo, Departamento de Neurología. Exploración neurológica. En: Wiebers DO, Dale AJD, Kokmen E, Swanson JW, editores. Clínica Mayo: Exploración clínica en Neurología. 7ma ed. Barcelona: Editorial Médica JIMS; 1999. p. 1-408.

## **Anexo 7. Escala clínica para la evaluación cuantitativa de la ataxia<sup>4</sup>**

### **Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA)**

**I- Marcha (0 a 8 puntos):** se le indica al paciente que realice un giro en dirección opuesta a la marcha paralelamente a la pared. Habrá de caminar en tándem sin soporte.

0-Normal. No hay dificultades al caminar, girar ni en el tándem (es permitido un error).

1-Dificultad ligera. La dificultad sólo es evidente cuando el paciente camina 10 pasos consecutivos en tándem.

2-Evidentemente anormal. No es posible realizar la marcha en tándem por encima de 10 pasos.

3-Tambaleo considerable. Presenta dificultad en la media vuelta, pero no necesita soporte.

4- Tambaleo marcado. Necesita soporte intermitente en la pared.

5- Tambaleo severo. Necesita soporte permanente de una vara, palo, bastón o necesita un soporte ligero por un brazo.

6- Camina más de 10 metros sólo con un soporte fuerte (dos bastones especiales o una persona acompañante).

7- Camina menos de 10 m con un soporte fuerte (dos bastones especiales o una persona acompañante).

8- Incapaz de caminar aún con soporte.

**II- Postura (0 a 6 puntos):** se le indica al paciente que se ponga de pie en posición natural, luego se le indica posición de los dos pies juntos en paralelo y en tándem sin

que exista espacio entre los dos pies. Permanecerá con los zapatos puestos y los ojos abiertos. Se repetirá tres veces para cada posición y se tomará el mejor resultado obtenido.

0- Normal. Es capaz de pararse en tándem por más de 10 segundos.

1- Es capaz de pararse con los pies juntos y sin oscilaciones, pero incapaz de permanecer en tándem por más de 10 segundos.

2- Es capaz de pararse con los pies juntos por más de 10 segundos, pero únicamente con oscilaciones.

3- Es capaz de pararse por más de 10 segundos sin soporte en posición natural, pero no con los pies juntos.

4- Es capaz de pararse por más de 10 segundos en posición natural sólo con soporte intermitente.

5- Es capaz de pararse más de 10 segundos en posición natural sólo con soporte constante por uno de los dos brazos.

6- Es incapaz de pararse por más de 10 segundos aún con soporte constante por uno de los dos brazos.

**III- Sentarse (0 a 4 puntos):** se le indica al paciente que se sienta en la cama del examen, sin soporte en los pies, con los ojos abiertos y los brazos levantados al frente.

0- Normal. No presenta dificultades al sentarse por más de 10 segundos.

1- Dificultades ligeras, con oscilaciones intermitentes.

2- Oscilaciones constantes, pero es capaz de sentarse durante más de 10 segundos sin soporte.

3- Es capaz de sentarse durante más de 10 segundos con soporte intermitente.

4- Es incapaz de sentarse durante más de 10 segundos sin soporte continuo.

**IV- Trastornos del lenguaje (0 a 6 puntos):** se exploran durante una conversación normal.

0- Normal.

1- Sugestivo de trastornos del habla.

2- Lenguaje dañado, pero fácil de comprender.

3- Dificultad ocasional para comprender el lenguaje.

4- Muchas palabras se hacen difíciles de comprender.

5- Solamente puede comprender cinco palabras.

6- Anartria.

**V- Persecución con el dedo índice (0 a 4 puntos):** se evalúa cada lado (derecho e izquierdo). El paciente se sienta confortablemente, si es necesario con soporte en los pies y el tronco. El examinador se sienta frente al paciente y ejecuta cinco movimientos consecutivos, súbitos y rápidos de punteo, en direcciones impredecibles, en un plano frontal al alcance del paciente. Los movimientos tendrán una amplitud de 30 cm y una secuencia de un movimiento cada dos segundos. El paciente realiza movimientos de persecución con un dedo índice tan rápido y sucesivo como le sea posible. Se calcula el promedio de la cuantificación.

0- No disimetría.

1- Disimetría (hiper/hipometría) menor de 5 cm al blanco.

2- Disimetría menor de 15 cm al blanco.

3- Disimetría mayor de 15 cm al blanco.

4- Incapaz de realizar 5 movimientos de persecución.

**VI- Prueba índice–nariz (0 a 4 puntos):** se evalúa cada lado (derecho e izquierdo).

El paciente se sienta confortablemente, si es necesario con soporte en pies y tronco.

Se le indica que realice movimientos desde su nariz hasta el dedo índice del explorador, el cual se coloca al frente del paciente y realiza los movimientos a una velocidad moderada. Se promedian ambos movimientos de acuerdo a la amplitud del temblor cinético al dedo del examinador que permanece fijo. El paciente hace cinco movimientos con cada mano. Se cuantifican por separado ambos lados y se obtiene el promedio.

0- No temblor.

1- Temblor con amplitud menor de 2 cm.

2- Temblor con amplitud menor de 5 cm.

3- Temblor con amplitud mayor de 5 cm.

4- Incapaz de realizar los cinco movimientos de persecución.

**VII- Movimientos rápidos alternantes de las manos (0 a 4 puntos):** se evalúa

cada lado (derecho e izquierdo). El paciente se sienta confortablemente, si es necesario con soporte en pies y tronco. Se le indica que realice 10 ciclos repetitivos de movimientos de prono supinación de las manos sobre sus muslos tan rápido y preciso como le sea posible; el movimiento es demostrado por el examinador a una velocidad aproximada de 10 ciclos dentro de siete segundos. El tiempo exacto para la ejecución del movimiento tiene que ser medido. Se cuantifican por separado ambos lados y se obtiene el promedio.

0- Normal. No irregularidades, ejecución en menos de 10 segundos.

- 1- Irregularidades ligeras, ejecución en menos de 10 segundos.
- 2- Claramente irregular. Los movimientos simples son difíciles de distinguir o tienen interrupciones relevantes, pero se ejecutan en menos de 10 segundos.
- 3- Muy irregular. Los movimientos simples son difíciles de distinguir o tienen interrupciones relevantes, se ejecutan con un tiempo mayor de 10 segundos.
- 4- Es incapaz de completar los 10 ciclos.

**VIII- Prueba talón–rodilla (0 a 4 puntos):** el paciente se acuesta en una cama y se le indica que toque con el talón del pie la rodilla opuesta y que lo desplace hacia abajo por la espinilla. La tarea se ejecuta tres veces. Se cuantifican por separado ambos lados y se obtiene el promedio.

0- Normal.

1- Ligeramente anormal. Mantiene el contacto con la espinilla.

2- Claramente anormal. Desliza el talón por fuera de la espinilla tres veces en los tres ciclos.

3- Severamente anormal. Desliza el talón por fuera de la espinilla cuatro o más veces en los tres ciclos.

4- Incapaz de realizar la tarea.

---

<sup>4</sup>Schmitz-Hubsch T, Tezenas du Montcel S, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*. 2006; 66: 1717-1720.

## Anexo 8. Operacionalización de las variables

### Anexo 8A. Operacionalización de las variables genealógicas evaluadas en los sujetos afectados por ataxia de Friedreich

Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
		Conceptual	Operacional
Consanguinidad	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como aquellas uniones entre personas biológicamente relacionadas, teniendo uno o más ancestros comunes no más remotos que el tatarabuelo.	-Presente  -Ausente
Herencia autosómica recesiva	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el patrón de herencia más probable en aquellas familias donde los individuos afectados lo son independientemente del sexo, resultan descendientes de padres saludables, consanguíneos, o guardan relación de parentesco por ser hermanos o primos hermanos, pudiendo encontrarse en la misma generación.	-Presente  -Ausente
Caso esporádico	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como aquel individuo enfermo que no tiene antecedentes de familiares afectados, siendo sus padres saludables y no consanguíneos.	-Presente  -Ausente

**Anexo 8B. Operacionalización de las variables epidemiológicas evaluadas en los sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
		Conceptual	Operacional
Edad	Cuantitativa continua	Se definió como el tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo hasta el momento en que se estudia.	Se expresó en años
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió de acuerdo al género biológico de pertenencia según el examen físico.	-Masculino -Femenino
Origen ancestral	Cualitativa nominal politómica	Se clasificó según la provincia del país donde nació el individuo (teniendo en cuenta la división político-administrativa existente en el país al comienzo del estudio), o el país de origen de sus abuelos cuando este fuese diferente de Cuba. Se obtuvo a través del interrogatorio del sujeto afectado y de sus familiares.	-Pinar del Río. -Ciudad de la Habana. -Provincia Habana. -Matanzas. -Cienfuegos. -Villa Clara. -Sancti Spiritus. -Ciego de Ávila. -Camaguey, -Las Tunas. -Holguín. -Granma. -Santiago de Cuba. -Guantánamo. -España.

**Anexo 8C. Operacionalización de las variables clínicas evaluadas en los sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
		Conceptual	Operacional
Antecedentes patológicos familiares de aborto espontáneo	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como la ocurrencia de al menos un aborto espontáneo en la madre del sujeto afectado.	-Presente -Ausente
Antecedentes patológicos familiares de Diabetes Mellitus	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como la existencia de Diabetes Mellitus en familiares de primero y/o segundo grado del sujeto afectado.	-Presente -Ausente
Edad de inicio de la enfermedad	Cuantitativa continua	Se consideró como la edad en años cumplidos al momento de iniciar las primeras manifestaciones clínicas somáticas. Se obtuvo mediante el interrogatorio al enfermo y sus familiares.	Se expresó en años
Edad de inicio de la ataxia	Cuantitativa continua	Se consideró como la edad en años cumplidos al momento de iniciar los trastornos de coordinación y/o la pérdida del equilibrio. Se obtuvo mediante el interrogatorio al enfermo y sus familiares.	Se expresó en años
Tiempo de evolución de la enfermedad	Cuantitativa continua	Se definió como el tiempo transcurrido desde la manifestación de los primeros síntomas y/o signos clínicos hasta el momento en que se estudia al individuo en cuestión. Se obtuvo a partir del cálculo de la diferencia de edad cronológica del enfermo en el momento del estudio con relación a la edad de inicio de la enfermedad.	Se expresó en años

Síntoma y/o signo de presentación	Cualitativa nominal politómica	Síntoma y/o signo al inicio de la enfermedad teniendo en cuenta las manifestaciones clásicas de presentación de la enfermedad.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Trastornos de la marcha</li> <li>-Disimetría</li> <li>-Escoliosis</li> <li>-Cardiomiopatía</li> </ul>
Manifestaciones neurológicas cerebelosas	Cualitativa nominal politómica	Síntomas y/o signos neurológicos cerebelosos teniendo en cuenta las manifestaciones clásicas de presentación de la enfermedad.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ataxia de la marcha</li> <li>-Ataxia del tronco</li> <li>-Temblor postural de cabeza y/o cuello</li> <li>-Disartria</li> <li>-Disimetría</li> <li>-Adiadococinesia</li> <li>-Temblor de intención</li> <li>-Hipotonía muscular</li> <li>-Nistagmo horizontal</li> </ul>
Manifestaciones neurológicas no cerebelosas	Cualitativa nominal politómica	Síntomas y/o signos neurológicos no cerebelosos teniendo en cuenta las manifestaciones clásicas de presentación de la enfermedad.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Trastornos en el sentido de posición</li> <li>-Trastornos en el sentido de vibración</li> <li>-Reflejos osteotendinosos disminuidos o abolidos</li> <li>-Respuesta plantar extensora</li> <li>-Atrofia muscular distal</li> <li>-Atrofia óptica</li> <li>-Sordera sensorineural</li> </ul>
Puntuación total de ataxia según SARA	Cuantitativa continua	Se definió como la sumatoria de las puntuaciones parciales de la escala SARA. A mayor puntuación de la escala existieron mayores alteraciones clínicas del sistema neurológico somático <sup>4</sup> .	Se expresó en puntos con un valor total de 0 a 40

**Anexo 8D. Operacionalización de la variable del estudio del metabolismo de la glucosa evaluada en los sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
		Conceptual	Operacional
Glucemia post-sobrecarga	Cualitativa ordinal	Se definió como el nivel de glucosa en plasma venoso a las dos horas de haber administrado sobrecarga oral de glucosa. Se clasificó en tres grupos: normal, alterada y Diabetes Mellitus, de acuerdo a los valores de referencia del laboratorio clínico del Hospital Clínico Quirúrgico “Lucía Íñiguez Landín”.	<p>&lt; 7,0 mmol/L (normal)</p> <p>7,1 – 11,0 mmol/L (alterada)</p> <p>&gt;11,1 mmol/L (Diabetes Mellitus)</p>

**Anexo 8E. Operacionalización de las variables de los estudios imagenológicos evaluadas en los sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
		Conceptual	Operacional
Cardiomiopatía hipertrófica	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como hipertrofia simétrica y concéntrica del ventrículo izquierdo en la ecocardiografía <sup>5</sup> teniendo en cuenta los valores de referencia para la población adulta <sup>6</sup> .	-Presente -Ausente
Escoliosis	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como una curvatura lateral mayor de 10 grados en la radiografía de columna vertebral, acompañada por rotación de los cuerpos vertebrales.	-Presente -Ausente
Diámetro anteroposterior de la médula cervical	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el diámetro anteroposterior de la médula cervical a nivel de C2 <sup>7</sup> .	-Normal -Disminuido
Diámetro anteroposterior del canal medular	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el diámetro anteroposterior del canal medular a nivel de C2 <sup>7</sup> .	-Normal -Disminuido
Cociente entre el diámetro medular y el diámetro del canal raquídeo	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el cociente entre el diámetro medular y el diámetro del canal raquídeo a nivel de C2 <sup>7</sup> .	-Normal -Disminuido
Área del cerebelo	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el área que determina el vermis cerebeloso <sup>7</sup> .	-Normal -Disminuida

Área de la fosa posterior	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el área determinada anteriormente por el borde posterior del esfenoides, en la parte superior por la línea entre el clinoides posterior y la parte anterior del borde inferior del seno recto, posteriormente por el borde inferior del seno recto y el borde del hueso occipital, e inferiormente por la línea que une el punto inferior del hueso occipital con el punto inferior de hueso esfenoides <sup>7</sup> .	-Normal -Disminuida
Cociente entre el área del cerebelo y el área de la fosa posterior	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el cociente entre el área del cerebelo y el área de la fosa posterior <sup>7</sup> .	-Normal -Disminuido
Diámetro anteroposterior de la protuberancia	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como el diámetro anteroposterior máximo perpendicular al eje de protuberancia <sup>7</sup> .	-Normal -Disminuido

---

<sup>5</sup>Wynne Joshua, Braunwald E. Miocardiopatías y miocarditis. En: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, editores. Braunwald's Cardiología. "El libro" de medicina cardiovascular. Tomo 3. España: Editorial Marban; 2004. p. 2155-2171.

<sup>6</sup>Armstrong WF, Feigenbaum H. Ecocardiografía. p. 201. En: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, editores. Braunwald's Cardiología. "El libro" de medicina cardiovascular. Tomo 1. España: Editorial Marban; 2004. p. 66-77.

<sup>7</sup>Villanueva-Haba VE, Vílchez JJ, Sánchez MG, Bataller L, Palau F. Estudio de neuroimagen con análisis morfométrico de las ataxias hereditarias e idiopáticas. Rev Neurol. 2001; 16: 105-111.

**Anexo 8F. Operacionalización de las variables de los estudios electrofisiológicos evaluadas en los sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

Estudio	Variables	Naturaleza de las variables	Definición	
			Conceptual	Operacional
Electrocardiograma	Trastornos de repolarización ventricular	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como una alteración en la recuperación ventricular, expresada como existencia de patrones de ondas T anormales en el electrocardiograma <sup>8</sup> .	-Presente -Ausente
	Trastornos de conducción intraauricular	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió como una alteración en la secuencia normal de la activación auricular, expresado como existencia de patrones de ondas P anormales en el electrocardiograma <sup>8</sup> .	-Presente -Ausente
Audiometría	Intensidad	Cuantitativa discreta	Amplitud de las vibraciones sonoras.	Se expresó en dB
	Frecuencia	Cuantitativa discreta	Cantidad de ciclos o vibraciones dobles en la unidad de tiempo.	Se expresó en kHz
Estudio de conducción nerviosa periférica motora	Latencia	Cuantitativa continua	Es el intervalo de tiempo que existe entre el momento de la estimulación y el inicio del potencial evocado o potencial de acción resultante. Se consideró como valor máximo normal el de la media para los controles más dos desviaciones estándar de acuerdo a los valores de referencia del CIRAH <sup>9</sup> .	Se expresó en ms
	Amplitud	Cuantitativa continua	Se midió la amplitud pico a pico. Representa la altura de la respuesta evocada determinada desde el primer pico positivo o negativo máximo hasta el valor negativo o positivo máximo. Se consideró como valor mínimo normal el de la media para los controles menos dos desviaciones estándar <sup>9</sup> .	Se expresó en mV

	Velocidad de conducción	Cuantitativa continua	Se obtuvo mediante la estimulación del nervio en dos puntos de su trayecto y dividiendo la distancia entre ambos puntos por la diferencia entre las latencias proximal y distal de los potenciales. Se consideró como valor mínimo normal el de la media para los controles menos dos desviaciones estándar <sup>9</sup> .	Se expresó en m/s
Estudio de conducción nerviosa periférica sensitiva	Latencia	Cuantitativa continua	Es el intervalo de tiempo que existe entre el momento de la estimulación y el inicio del potencial evocado o potencial de acción resultante. Se consideró como valor máximo normal el de la media para los controles más dos desviaciones estándar <sup>9</sup> .	Se expresó en ms
	Amplitud	Cuantitativa continua	Se midió la amplitud pico a pico. Representa la altura de la respuesta evocada determinada desde el primer pico positivo o negativo máximo hasta el valor negativo o positivo máximo. Se consideró como valor mínimo normal el de la media para los controles menos dos desviaciones estándar <sup>9</sup> .	Se expresó en $\mu$ V
	Velocidad de conducción	Cuantitativa continua	Se obtuvo mediante el cociente que resulta de la distancia entre el sitio de estimulación del nervio y el de registro entre la latencia. Se consideró como valor mínimo normal el de la media para los controles menos dos desviaciones estándar <sup>9</sup> .	Se expresó en m/s
PESS	Onda P40	Cuantitativa continua	Potencial cortical que representa la llegada de los impulsos a la corteza somatosensorial primaria. Se consideró como valor máximo normal 38,40 <sup>9</sup> .	Se expresó en ms
PEATC	Onda I	Cuantitativa continua	Onda generada a nivel del nervio auditivo. Se consideró como valor máximo normal 1,56 <sup>9</sup> .	Se expresó en ms

	Onda III	Cuantitativa continua	Onda generada a nivel de la oliva superior. Se consideró como valor máximo normal 3,77 <sup>9</sup> .	Se expresó en ms
	Onda V	Cuantitativa continua	Onda generada a nivel del colículo inferior. Se consideró como valor máximo normal 5,66 <sup>9</sup> .	Se expresó en ms
	Intervalo I-III	Cuantitativa continua	Diferencias de latencia entre los picos I-III. Se consideró como valor máximo normal 2,21 <sup>9</sup> .	Se expresó en ms
	Intervalo III-V	Cuantitativa continua	Diferencias de latencia entre los picos III-V. Se consideró como valor máximo normal 1,89 <sup>9</sup> .	Se expresó en ms
PEV	Onda P100	Cuantitativa continua	Componente más estable para la evaluación de la actividad evocada visual en corteza cerebral. Se consideró como valor máximo normal 120 <sup>9</sup> .	Se expresó en ms

---

<sup>8</sup>Mirvis DM, Goldberger AL. Electrocardiografía. En: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, editores. Braunwald's Cardiología. "El libro" de medicina cardiovascular. Tomo 1. España: Editorial Marban; 2004. p. 111-116.

<sup>9</sup>Velázquez PL, Sánchez CG, Canales ON, Rodríguez LG, Rodríguez DJ, Almaguer MLE, et al. Electrophysiological features in patients and presymptomatic relatives with spinocerebellar ataxia type 2. Journal of Neurological Sciences. 2007; 263: 158-164.

**Anexo 8G. Operacionalización de las variables de los estudios moleculares evaluadas en los sujetos afectados por ataxia de Friedreich**

Genes	Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
			Conceptual	Operacional
FRDA	Alelos FRDA expandidos	Cuantitativa discreta	Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen FRDA con más de 66 repeticiones del trinucleótido GAA.	Se expresó en unidades de GAA
	Genotipo FRDA	Cuantitativa discreta	Se definió como la constitución genética del individuo con respecto al locus FRDA, expresado como el resultado de la sumatoria del número de repeticiones de GAA en los alelos FRDA o como variable categórica donde cada combinación alélica representa una categoría específica.	Se expresó en unidades de GAA
	Inestabilidad intergeneracional	Cualitativa nominal dicotómica	Cambio en el número de repeticiones de GAA del gen FRDA durante su transmisión de progenitores a descendientes.	-Presente -Ausente
SCA2 SCA3 SCA17 HD	Alelos normales	Cuantitativa discreta	Se definieron como aquellos alelos con un número de repeticiones del trinucleótido CAG en el rango de los valores de referencia para la población normal: SCA2: 13-31; SCA3: 12-44; SCA17: 25-42; HD:6-35.	Se expresó en unidades de CAG

	Alelos normales largos	Cuantitativa discreta	Se definieron como aquellos alelos con un número de repeticiones del trinucleótido dentro del rango mayor de los valores de referencia para la población normal: SCA2: 23-31; SCA3: 30-44; SCA17: 38-42; HD: 27-35.	Se expresó en unidades de CAG
	Alelos expandidos	Cuantitativa discreta	Se definieron como aquellos alelos con mayor número de repeticiones del trinucleótido según los siguientes valores de referencia para la población normal: SCA2: 32-79; SCA3: 61-87; SCA17: 43-48; HD: 36-121.	Se expresó en unidades de CAG
	Genotipo	Cuantitativa discreta	Se definió como la constitución genética del individuo con respecto al locus en cuestión, expresado como el resultado de la sumatoria del número de repeticiones de CAG en los dos alelos del gen.	Se expresó en unidades de CAG

**Anexo 8H. Operacionalización de las variables epidemiológicas evaluadas en los sujetos sanos**

Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
		Conceptual	Operacional
Edad	Cuantitativa continua	Se definió como el tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo hasta el momento en que se estudia.	Se expresó en años
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	Se definió de acuerdo al género biológico de pertenencia según el examen físico.	-Masculino -Femenino

**Anexo 8I. Operacionalización de las variables de los estudios moleculares evaluadas en los sujetos sanos**

Variable	Naturaleza de la variable	Definición	
		Conceptual	Operacional
Alelos FRDA normales	Cuantitativa discreta	Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen FRDA con 5 a 33 repeticiones del trinucleótido GAA.	Se expresó en unidades de GAA
Alelos FRDA normales cortos	Cuantitativa discreta	Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen FRDA con 5 a 12 repeticiones del trinucleótido GAA.	Se expresó en unidades de GAA
Alelos FRDA normales largos	Cuantitativa discreta	Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen FRDA con 13 a 26 repeticiones.	Se expresó en unidades de GAA
Alelos FRDA raros	Cuantitativa discreta	Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen FRDA con 27 a 33 repeticiones.	Se expresó en unidades de GAA
Alelos FRDA premutados	Cuantitativa discreta	Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen FRDA con 34 a 65 repeticiones del trinucleótido GAA.	Se expresó en unidades de GAA
Genotipo homoalélico	Cuantitativa discreta	Genotipo conformado por dos alelos iguales.	Se expresó en unidades de GAA
Genotipo heteroalélico	Cuantitativa discreta	Genotipo conformado por dos alelos diferentes.	Se expresó en unidades de GAA

**Anexo 9. Consentimiento informado de participación en el estudio de familias cubanas afectadas por ataxia de Friedreich.**

**CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA REHABILITACIÓN  
DE LAS ATAXIAS HEREDITARIAS “Carlos J. Finlay”**

Yo \_\_\_\_\_ participo voluntariamente en una investigación que tiene como objetivo conocer las características clínicas y genéticas de la ataxia de Friedreich en las familias cubanas. Estoy dispuesto a participar en la Entrevista Clínica requerida en la investigación y permito el uso de la información contenida en mi Historia Clínica por parte de los investigadores, sabiendo que toda la información recogida se mantendrá reservada y es confidencial. Conozco que el diagnóstico de la enfermedad se basa en tres aspectos fundamentales: caracterización clínica, estudios neurofisiológicos y análisis de las alteraciones existentes en el ADN o material genético (estudio molecular). Para este último es necesaria la extracción de una muestra de sangre periférica de 10 ml, que se realiza con material estéril y no implica daños para mi salud.

Una vez analizada la muestra de ADN, pueden obtenerse diferentes resultados:

- Resultar no informativo, debido a la gran variabilidad del gen y la complejidad del estudio.
- Resultar informativo, en cuyo caso se confirma el diagnóstico de sano, portador o enfermo.

Estos resultados no tienen fines diagnósticos sino investigativos, por lo cual no se me darán a conocer, a menos que habiendo resultado informativos resulten beneficiosos

para mi salud. No serán revelados a otros miembros de mi familia u otras personas. Autorizo su utilización en publicaciones y con otros fines investigativos siempre y cuando se mantenga sin revelar mi identidad. Si de la investigación se derivaran bienes materiales, se me ha informado que no seré beneficiado con los mismos. Afirmo y confirmo que mi participación es completamente voluntaria.

Cooperaré con la localización a través de mí de otros miembros de mi familia en caso de que esto resultase necesario. Se me ha explicado que puedo retirarme de la investigación en cualquier momento, si así lo estimo pertinente, sin que deba dar explicaciones acerca de mi decisión, lo cual no afectará mis relaciones con el personal de salud a cargo de la misma.

He realizado todas las preguntas que consideré necesarias acerca de la investigación y en caso de que desee aportar algún nuevo dato o recibir más información sobre el estudio o la enfermedad, conozco que puedo dirigirme a:

*Dra. Tania Cruz Mariño. Centro Municipal d Genética, teléfono 422677.*

*DrC. Luis Velázquez Pérez. Centro para la Investigación y la Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias, teléfono 424090.*

Estoy conforme con todo lo expuesto y para que así conste firmo a continuación expresando mi consentimiento:

Nombre y Apellidos \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Dirección particular \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_ Lugar \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Miembro del Proyecto \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**Anexo 10. Consentimiento informado de participación en el estudio del gen FRDA en la población cubana saludable.**

**CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA REHABILITACIÓN**

**DE LAS ATAXIAS HEREDITARIAS “Carlos J. Finlay”**

Yo \_\_\_\_\_ participo voluntariamente en una investigación que tiene como objetivo conocer las características del gen FRDA en la población cubana saludable.

Estoy dispuesto a participar en la entrevista clínica requerida en la investigación y conozco que me será realizado examen físico general que incluirá examen neurológico. Permito el uso de la información contenida en mi Historia Clínica por parte de los investigadores, sabiendo que toda la información recogida se mantendrá reservada y es confidencial.

Declaro que soy mayor de 25 años y que no presento antecedentes personales o familiares de ataxia ni de otras enfermedades neurológicas. Conozco que para el estudio del gen FRDA es necesaria la extracción de una muestra de sangre periférica de 10 ml, que se realiza con material estéril y no implica daños para mi salud.

Los resultados de este estudio no tienen fines diagnósticos sino investigativos, por lo cual no se me darán a conocer, ni serán revelados a otros miembros de mi familia u otras personas. Autorizo su utilización en publicaciones y con otros fines investigativos siempre y cuando se mantenga sin revelar mi identidad. Si de la investigación se derivaran bienes materiales, se me ha informado que no seré beneficiado con los mismos. Afirmo y confirmo que mi participación es completamente voluntaria.

Se me ha explicado que puedo retirarme de la investigación en cualquier momento, si así lo estimo pertinente, sin que deba dar explicaciones acerca de mi decisión, lo cual no afectará mis relaciones con el personal de salud a cargo de la misma.

He realizado todas las preguntas que consideré necesarias acerca de la investigación y en caso de que desee aportar algún nuevo dato o recibir más información sobre el estudio, conozco que puedo dirigirme a:

*Dra. Tania Cruz Mariño. Centro Municipal d Genética, teléfono 422677.*

*DrC. Luis Velázquez Pérez. Centro para la Investigación y la Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias, teléfono 424090.*

Estoy conforme con todo lo expuesto y para que así conste firmo a continuación expresando mi consentimiento:

Nombre y Apellidos \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Dirección particular \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_ Lugar \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Miembro del Proyecto \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**Anexo 11. Compromiso de confidencialidad de los investigadores sobre la información relacionada con la investigación**

Yo \_\_\_\_\_

participo en una investigación que tiene como objetivo conocer las características del gen FRDA en la población cubana saludable y caracterizar epidemiológica, molecular y clínicamente a las familias cubanas afectadas por ataxia de Friedreich.

En mi condición de \_\_\_\_\_

tendré acceso a información contenida en historias clínicas, bases de datos y/o registros de laboratorio. Esta información es confidencial, siendo mi responsabilidad mantenerla reservada y protegida, por lo cual no la revelaré bajo ninguna circunstancia a otras personas que no sean los integrantes del proyecto de investigación.

Me comprometo además a tomar todas las precauciones necesarias y suficientes para evitar que la identidad de alguno de los participantes sea revelada a través de información publicada en los medios científicos.

Para que así conste firmo a continuación expresando mi compromiso de confidencialidad:

Nombre y Apellidos \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_ Lugar \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

Jefe del Proyecto \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

## Anexo 12. Estimación del riesgo de recurrencia

Para la población cubana la frecuencia de portador de la AF ha sido estimada como 1 en 685 individuos, esa es la probabilidad que presentan los miembros de la población general de ser portadores de una mutación en el gen FRDA. La probabilidad *a priori* de tener descendencia afectada para la pareja conformada por un portador de un alelo mutado y un individuo de la población general resulta<sup>12</sup>:

Múltiplo de la probabilidad de ser portador de cada miembro de la pareja multiplicado por  $\frac{1}{4}$ .

$$1 \times \frac{1}{685} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{2740}$$

Si se tiene en cuenta que existe una probabilidad de un 98% de que un sujeto afectado por AF presente dos alelos expandidos en el gen FRDA, se puede estimar el riesgo de ser portador modificado por el análisis mutacional mediante el Teorema de Bayes<sup>(10)</sup>, para un sujeto proveniente de la población general en el cual se ha demostrado la presencia de dos alelos normales para el gen FRDA:

Probabilidad	Ser portador	No ser portador
Probabilidad a priori	1/685	684/685
Probabilidad modificada	$1 - \frac{98}{100} = \frac{2}{100}$	1
Probabilidad conjunta	$(\frac{1}{685}) \times (\frac{2}{100}) = \frac{2}{68500}$	$1 \times \frac{684}{685}$
Probabilidad final	$\frac{(\frac{2}{68500} + \frac{684}{685})}{(\frac{2}{68500} + \frac{684}{685}) + \frac{684}{685}}$ = 2/68402	$\frac{(\frac{684}{685})}{(\frac{2}{68500} + \frac{684}{685}) + \frac{684}{685}}$ = 68400/68402

Ahora el riesgo de recurrencia para la descendencia de la pareja conformada por un portador y un sujeto proveniente de la población general con dos alelos normales para el gen FRDA resulta:

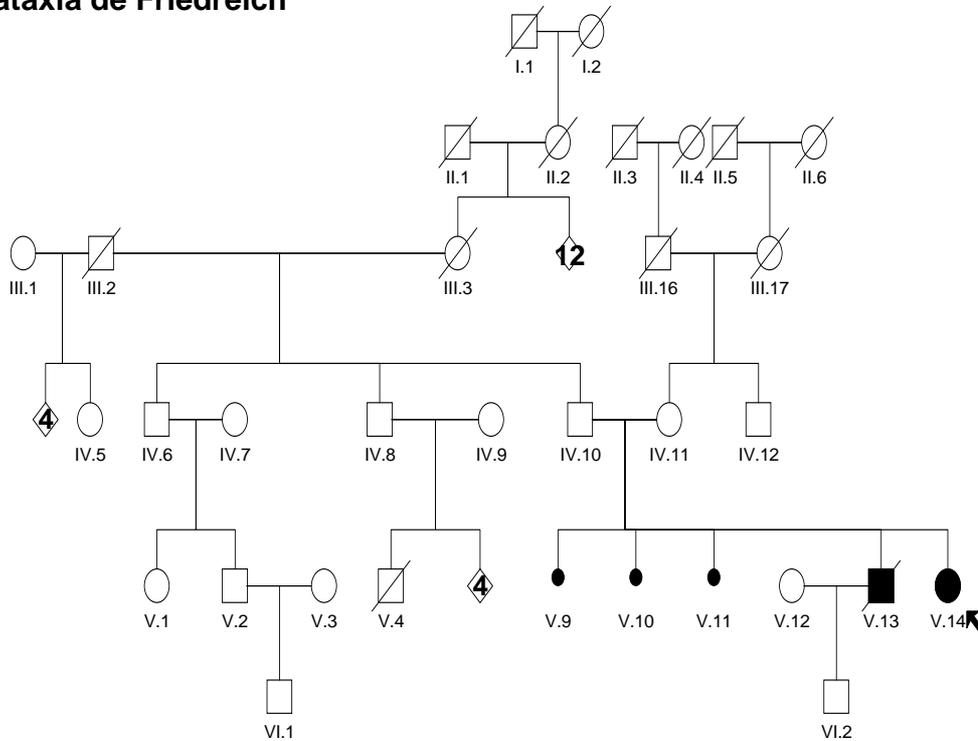
Múltiplo de la probabilidad de ser portador de cada miembro de la pareja multiplicado por  $\frac{1}{4}$ .

$$1 \times \frac{2}{68402} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{136804}$$

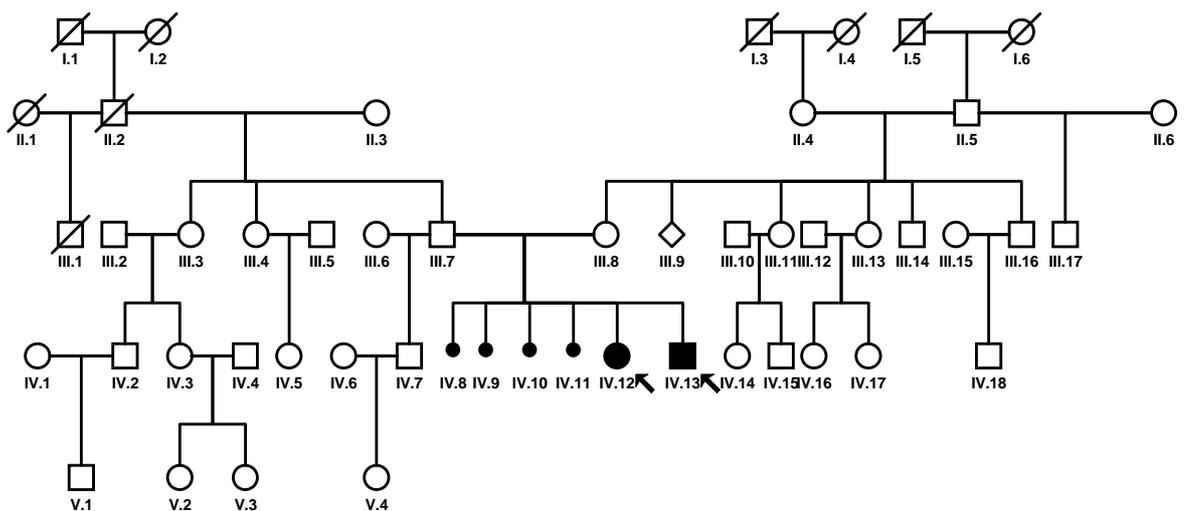
---

<sup>10</sup>Murphy EA, Mutalik GS. The application of Bayesian methods in genetic counseling. Human Hered. 1969; 19: 126-151.

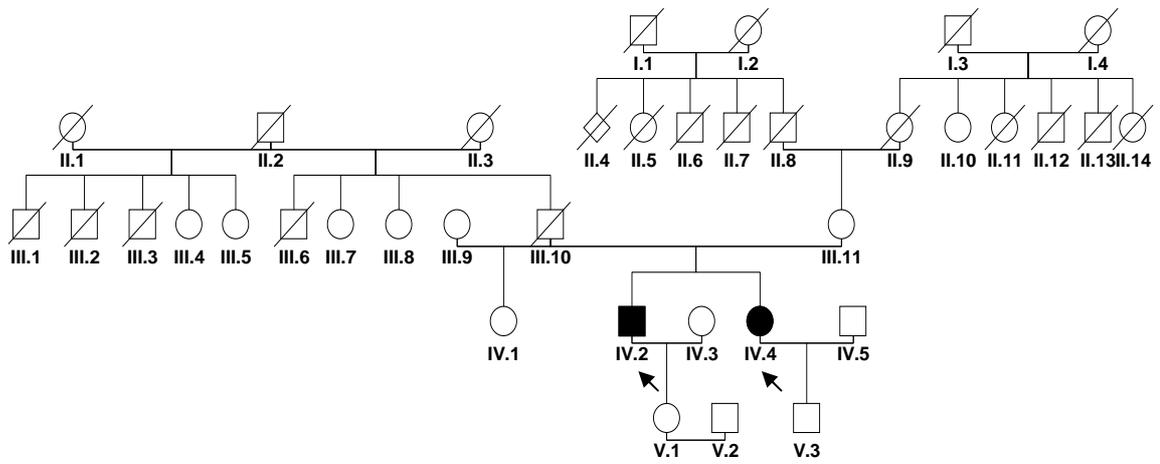
**Anexo 13. Árboles genealógicos correspondientes a las familias afectadas por ataxia de Friedreich**



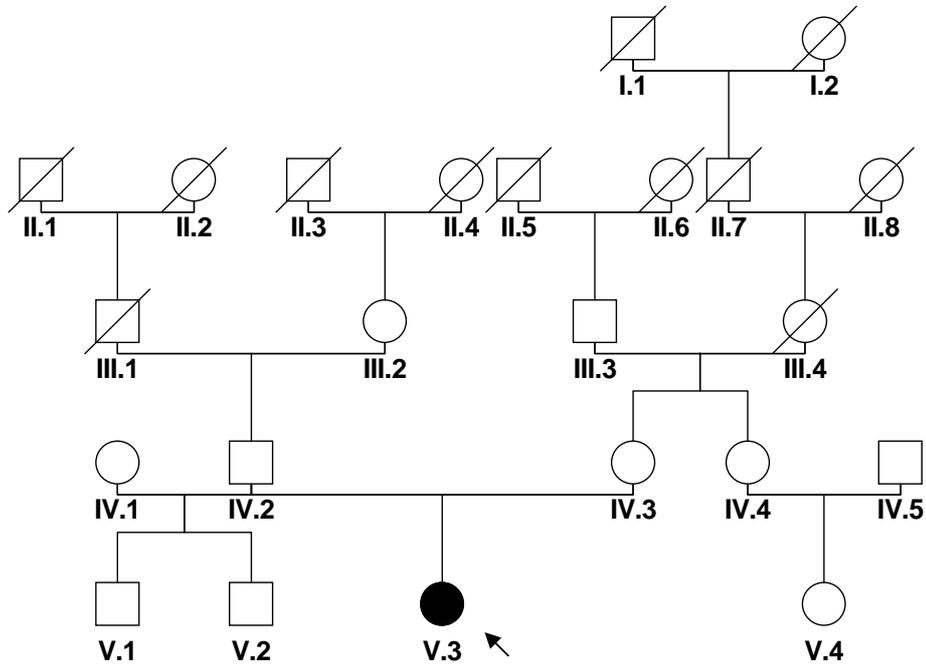
Anexo 13A. Familia 1. Individuo V.14 - Sujeto 1.



Anexo 13B. Familia 2. Individuo IV.12 – Sujeto 2; Individuo IV.13 – Sujeto 3.



Anexo 13C. Familia 3. Individuo IV.4 – Sujeito 4; Individuo IV.2 – Sujeito 5.



Anexo 13D. Familia 4. Individuo V.3 – Sujeito 6.

**Anexo 14. Sujetos afectados por ataxia de Friedreich en Cuba según localización geográfica**



**Anexo 15. Sujetos afectados por ataxia de Friedreich según variantes alélicas y genotípicas de los genes con secuencias trinucleotídicas repetitivas de CAG estudiados**

<b>Genes</b>												
<b>Sujetos</b>	<b>SCA2</b>			<b>SCA3</b>			<b>SCA17</b>			<b>HD</b>		
	A1	A2	Genotipo	A1	A2	Genotipo	A1	A2	Genotipo	A1	A2	Genotipo
1	21	<b>26</b>	47	15	23	18	30	37	67	19	19	38
2	22	22	44	21	23	44	35	36	71	17	20	37
3	23	24	47	20	23	43	35	37	42	17	20	37
4	23	23	46	22	<b>36</b>	58	34	35	69	17	17	34
5	23	23	46	22	<b>36</b>	58	35	37	42	17	17	34
6	23	23	46	23	23	46	35	37	42	14	20	34
Media±D.E	23±1,20		46±1,09	23,91±6,08		44,5 ±14,63	35,25±1,95		55,5±14,84	17,83±1,80		35,6±1,86

*Abreviaturas:* D.E-desviación estándar; A1-alelo 1; A2-alelo 2.

**Anexo 16. Análisis de correlación lineal de Spearman entre variables clínicas y entre variables clínicas y moleculares en sujetos con ataxia de Friedreich**

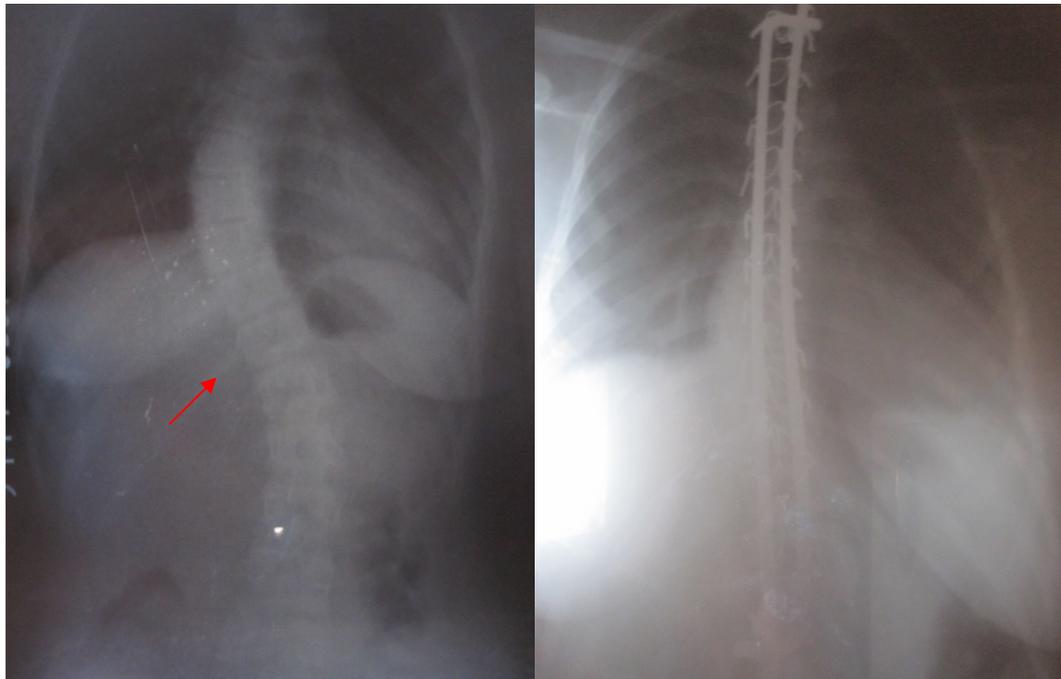
<b>Variables</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Edad de inicio / alelos FRDA expandidos de menor longitud	-0,8913	0,0171
Edad de inicio / alelos FRDA expandidos de mayor longitud	-0,8987	0,0149
Edad de inicio / genotipo	-0,8983	0,015
SARA / tiempo de evolución	0,8699	0,0243

**Anexo 17. Manifestación cerebelosa en individuo afectado por ataxia de Friedreich**



Dismetría en el sujeto 4.

**Anexo 18. Manifestaciones del sistema osteo-mio-articular en individuo afectado por ataxia de Friedreich**



Anexo 18A. Escoliosis tóraco-lumbar antes y después de la corrección quirúrgica en el sujeto 6.



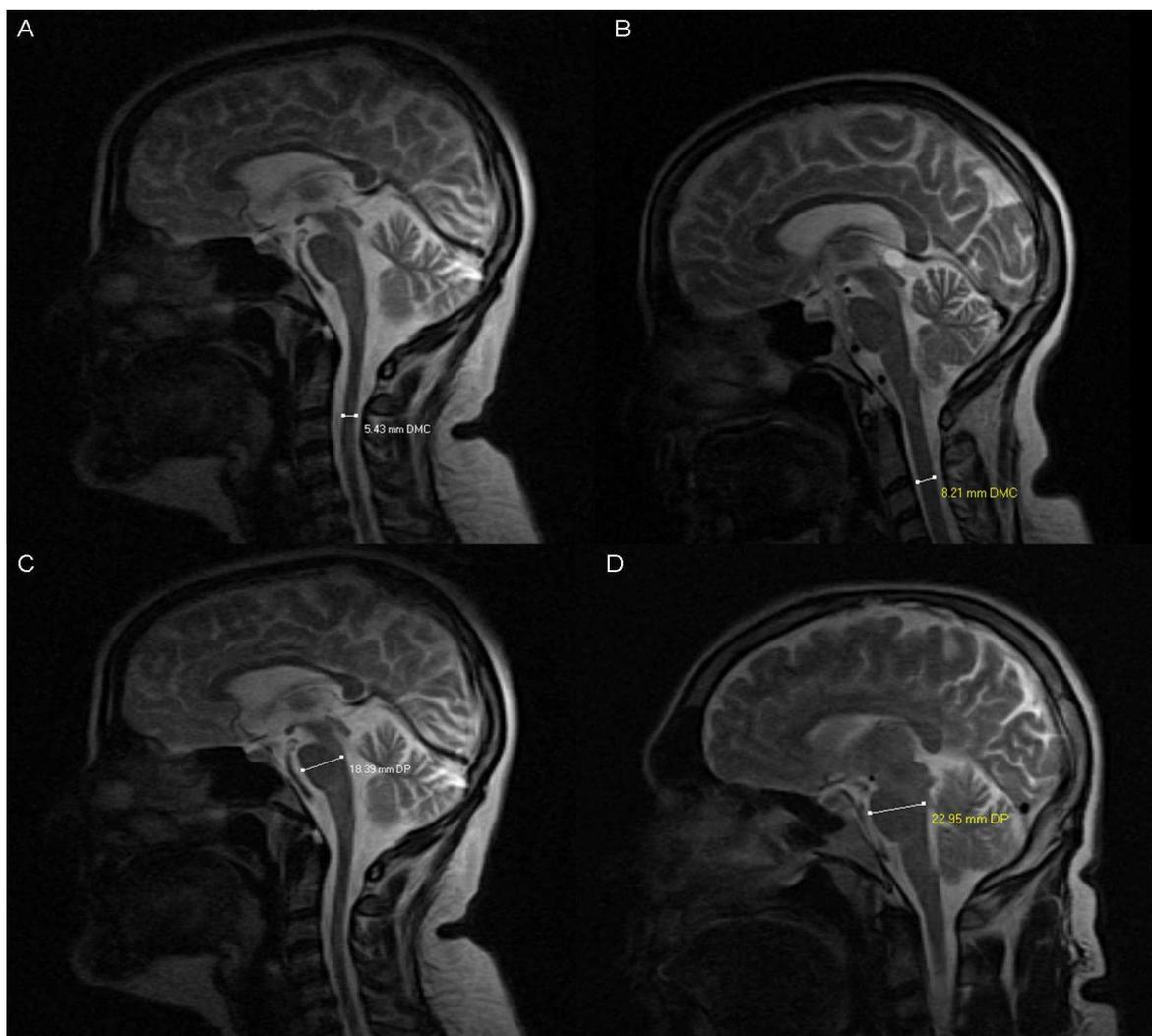
Anexo 18B. Pie cavo en el sujeto 6.

**Anexo 19. Escoliosis severa en individuo afectado por ataxia de Friedreich**



Escoliosis tóraco-lumbar con formación de giba e el sujeto 3.

**Anexo 20. Atrofia de médula cervical y protuberancia en individuo afectado por ataxia de Friedreich**



Anexo 20A. Diámetro anteroposterior de la médula cervical en el sujeto 4 mostrando atrofia de la médula cervical (5,43 mm).

Anexo 20B. Diámetro anteroposterior de la médula cervical en sujeto normal (8,21 mm).

Anexo 20C. Diámetro anteroposterior de la protuberancia en el sujeto 4 mostrando atrofia de la protuberancia (18,39 mm).

Anexo 20D. Diámetro anteroposterior de la protuberancia en sujeto normal (22,95 mm).

# **AUTOBIBLIOGRAFÍA**

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

### I. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS (Total: 20)

#### **la-) Publicaciones como primera autora (Total: 11)**

**1-Cruz-Mariño T**, González ZY, Laffita MJ, Mederos AL, Aguilera RR, Almaguer GD, et al. Uncommon Features in Cuban Patients Affected by Friedreich Ataxia. Neuroscience Letters. 2010 ; 472 : 85-89.

**2-Cruz-Mariño T**, González ZY, Laffita MJ, Mederos AL, Rodríguez AR, Almaguer GD, et al. Low predisposition to instability of the Friedreich ataxia gene in Cuban population. Clinical Genetics. 2010; 77: 598-600.

**3-Cruz-Mariño T**, Reynaldo AR, Jorge CH, Laffita MJ, González ZY, Rodríguez AR, et al. Ethical Dilemmas in Genetic Testing: Examples from the Cuban Program for Predictive Diagnosis of Hereditary Ataxias. Journal of Genetic Counseling. 2011; 20 (3): 241-248.

**4-Cruz-Mariño T**, Velazquez L, Sequeiros J, Paneque M. Ethical dilemmas in predictive testing: challenges for genetic counselors. European Journal of Human Genetics. 2011; 20 (2).

**5-Cruz-Mariño T**, González ZY, Laffita MJ, Mederos AL, Rodríguez AR, Almaguer GD, et al. Ataxia de Friedreich: del gen al riesgo de recurrencia en la población cubana. inFÁRMate. 2011; 7(26): e608-610. Disponible en: [www.infarmate.org.mx](http://www.infarmate.org.mx)

**6-Cruz-Mariño T**, González ZY, Velázquez SM, Estupiñán RA, Rodríguez AR, Vázquez MY, et al. Impacto del diagnóstico predictivo de las ataxias hereditarias en Cuba. inFÁRMate. 2011; 7(26): e136-138. Disponible en: [www.infarmate.org.mx](http://www.infarmate.org.mx)

**7-Cruz-Mariño T**, González ZY, Laffita MJ, Mederos AL, Rodríguez AR, Almaguer GD, et al. Friedreich ataxia gene in Cuban population. Movement Disorders. 2011; 26(2): s3

**8-Cruz-Mariño T**, Guisao MJ, González ZY. La Ataxia de Friedreich del pasado a la actualidad. Revista de Ciencias de Holguín. Diciembre de 2009. Revista de Ciencias de Holguín. 2009 (4). ISSN 1027-2127 (Disponible en URL: <http://www.ciencias.holguin.cu/2010/Enero/articulos/ARTI7.htm>).

**9-Cruz-Mariño T**, Portelles CA, Áreas ZW, Velázquez PL. Enfermedad cardiovascular en pacientes cubanos afectados por Ataxia de Friedreich. Revista de Ciencias de Holguín. Diciembre de 2010. Revista de Ciencias de Holguín. 2010 (4). ISSN 1027-2127 (Disponible en URL: <http://www.ciencias.holguin.cu/2011/Enero/articulos/htm>).

**10-Cruz-Mariño T**, Álvarez CJ, Aguilera RR, Velázquez PL. Resonancia Magnética Nuclear de cráneo en primeras familias cubanas diagnosticadas con ataxia de Friedreich. Revista de Ciencias de Holguín. Enero de 2011. Revista de Ciencias de Holguín. 2011 (1) (Disponible en URL: <http://www.ciencias.holguin.cu/2011/Febrero/articulos/htm>).

**11-Cruz-Mariño T**, Jorge CH, Reynaldo AR, González ZY, Velázquez PL. Baja predisposición a la inestabilidad del gen de la Ataxia de Friedreich en la población cubana. Medisur. 2010; 8(1). ISSN: 1727-897X.

**Ib-) Publicaciones como primera autora en temas relacionados con las ataxias hereditarias (Total: 2).**

**1-Cruz-Mariño T**, González ZY, Velázquez SM, Estupiñán RA, Rodríguez AR, Vázquez MY, et al. The Cuban program for SCA2 predictive diagnosis: A 1000 patients review. Movement Disorders. 2011; 26(2): s305-306.

**2-Cruz-Mariño T**, González ZY, Laffita MJ, Aguilera RR, Velázquez PL. Ataxia Espinocerebelosa tipo 2: estudios predictivos y dilemas éticos asociados. Medisur. 2010; 8(1). ISSN: 1727-897X.

**Ic-) Publicaciones como coautora en temas relacionados con las ataxias hereditarias (Total: 7).**

**1-Paneque HM**, Santos FN, Tamayo CV, Reynaldo AR, Velázquez PL, Almaguer ML, **Cruz-Mariño T**. Type 2 spinocerebellar ataxia: acceptance of prenatal diagnosis in descendents at risk. Rev. Neurol. 2001; 33 (10): 904-908.

**2-Paneque HM**, Prieto AL, Reynaldo RR, **Cruz-Mariño T**, Santos FN, Almaguer ML, et al. Psychological Aspects of Presymptomatic Diagnosis of Spinocerebellar Ataxia Type 2 in Cuba. Community Genetics. 2007; 10 (3): 132-139.

**3-Almaguer M LE**, Santos FN, Almira YR, González ZY, Cuello AD, Góngora EM, Herrera MP, Batallán KE, Armiñán RR, Manresa MV, Cruz GS, Laffita MJ, **Cruz-**

**Mariño T**, et al. Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. *Clinical Genetics*. 2010; 78(2): 169-174.

**4-Rodríguez LR**, Velázquez PL, Canales ON, Galicia PL, Reyes HV, Sanchez CG, Medrano MJ, Laffita MJ, Almaguer ML, González ZY, Torres PC, Peña AA, **Cruz-Mariño T**. Subtle Rapid Eye Movement Sleep Abnormalities in Presymptomatic Spinocerebellar Ataxia Type 2 Gene Carriers. *Movement Disorders*. 2011; 26(2): 347-350.

**5-Velázquez PL**, Rodríguez LR, García-Rodríguez JC, Almaguer ML, **Cruz-Mariño T**, Laffita MJ. A Comprehensive Review of Spinocerebellar Ataxia Type 2 in Cuba. *Cerebellum*. 2011; 10(2): 184-198.

**6- Velázquez PL**, Rodríguez LR, Sánchez CG, Laffita MJM, Almaguer MLE, Aguilera RR, Medrano MJ, Almaguer GD, **Cruz MT**, et al. Caracterización integral de la ataxia espinocerebelosa 2 en Cuba y su aplicación en proyectos de intervención. *Revista Cubana de Salud Pública*. 2011; 37 (3).

**7-Laffita MJ**, Velázquez PL, Santos FN, **Cruz-Mariño T**, González ZY, Vázquez MY, et al. Unexpanded and intermediate CAG polymorphisms at the SCA2 locus (ATXN2) in the Cuban population: evidence about the origin of expanded SCA2 alleles. *European Journal of Human Genetics*. 2012; 20: 41-49.

## **II. TRABAJOS CIENTÍFICOS REALIZADOS Y PRESENTADOS EN EVENTOS INTERNACIONALES, NACIONALES Y PROVINCIALES (Total: 19)**

### **Ila-) Eventos internacionales (Total: 13).**

**1-Friedreich ataxia case report.** Cartel. Segundo Simposio Internacional sobre Ataxias Hereditarias. Holguín, 2 al 4 de Noviembre de 2005.

**2-¿Ataxia de Friedreich o Atrofia Multisistémica?.** Cartel. Primer Congreso Internacional de Genética Comunitaria. Ciudad Habana, 12 de Mayo de 2006.

**3-Dilemas éticos en el diagnóstico predictivo de la Ataxia de Friedreich.** Cartel. Primer Congreso Internacional de Genética Comunitaria. Ciudad Habana, 12 de Mayo de 2006.

**4-El diagnóstico de la ataxia de Friedreich.** Presentación oral. VI Evento Internacional de Ética, Bioética y Derecho. Holguín, 18 al 21 de Octubre de 2006.

**5-Characterización molecular de familias cubanas afectadas por Ataxia de Friedreich.** Presentación oral. III Simposio Internacional de Ataxias Hereditarias. Holguín, 1 al 3 de Octubre de 2008.

**6-Molecular diagnosis of Friedreich ataxia in Cuba.** Cartel. III Simposio Internacional de Ataxias Hereditarias. Holguín, 1 al 3 de Octubre de 2008.

**7-FRDA gene in Cuban Population.** Cartel. V International Workshop on Machado-Joseph disease. Azores, Portugal, 1 al 3 de Abril de 2009.

**8-Diagnóstico Predictivo de las Ataxias Hereditarias.** Presentación oral. Congreso Internacional de Neurología y Neurocirugía NEUROCUBA 2009. Ciudad Habana, 17 de Abril de 2009.

**9-Programa de diagnósticos predictivos. Impactos y dilemas éticos.**

Conferencia. Primer Simposio Internacional de Ataxias Espinocerebelosas y Enfermedad de Parkinson. Etiopatogenia y Posibilidades Terapéuticas. Holguín, 1 al 3 de Marzo de 2011.

**10-Ataxia de Friedreich: del gen al riesgo de recurrencia en la población cubana.**

Cartel. Cuarto Congreso Internacional de Salud y Calidad de Vida. Holguín, 5 al 8 de Abril de 2011.

**11-Friedreich Ataxia Gene in Cuban Population.**

Cartel con presentación guiada. XV Congreso Internacional de Enfermedad de Parkinson y Trastornos del Movimiento. Toronto, Canadá, 5 al 9 de Junio de 2011.

**12-Molecular Diagnosis of Friedreich Ataxia in Cuban Families.**

Cartel. Segundo Congreso Internacional de Inmunofarmacología. Varadero, 26 al 30 de Junio de 2011.

**13-Cuban families affected with Friedreich ataxia.**

Presentación oral. Genetics, Primary Care and Developing Countries Workshop durante el Congreso internacional de Genética Humana. Montreal, Canadá, 10 al 11 de Octubre de 2011.

**IIb-) Eventos nacionales (Total: 3).**

**1-Diagnóstico Predictivo de las Ataxias Hereditarias.** Presentación oral. XIII Exposición Nacional "Forjadores del Futuro". Holguín, 24 de Septiembre de 2009.

**2-Baja predisposición a la inestabilidad del gen de la ataxia de Friedreich en la población cubana.**

Cartel. Congreso Nacional de Neurología. Cienfuegos, 16 al 18 Marzo de 2010.

**3-Aspectos éticos del diagnóstico predictivo en las ataxias hereditarias.**

Conferencia. Taller Nacional de Diagnóstico Genético Presintomático de Enfermedades Genéticas de Aparición Tardía. Ciudad Habana, 2 al 3 de Noviembre de 2011.

**IIc) Eventos provinciales (Total: 3).**

**1-Primeras familias cubanas con diagnóstico molecular de Ataxia de Friedreich.** Presentación oral. XVI Forum de Ciencia y Técnica Segunda Etapa, CIRAH. 23 de Mayo de 2008.

**2-Familias cubanas afectadas por ataxias hereditarias como candidatas al DGPI.** Presentación oral. Exposición Forjadores del Futuro. CIRAH, 24 de Abril de 2009.

**3-Características del gen FRDA en la población cubana.** Presentación oral. Evento de mujeres creadoras. CIRAH, 4 de Noviembre de 2009.

**III. PREMIOS Y CONDECORACIONES RECIBIDOS POR LOS RESULTADOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON LA TESIS (Total: 11).**

**IIIa-) Premios internacionales (Total: 4).**

**1-Premio de la Red Latinoamericana de Genética (RELAG)** para participar en el V Curso de la Escuela Latinoamericana de Genética. Caxias do Sul, Brazil, 10 al 16 de Mayo de 2009.

**2-Premio de la Sociedad de Trastornos del Movimiento (Movements Disorders Society)** para participar en el XV Congreso Internacional de Enfermedad de Parkinson y Trastornos del Movimiento. Toronto, Canadá, 5 al 9 de Junio de 2011.

**3-Premio del Colegio Canadiense de Médicos Genetistas (Canadian Collegue of Medical Geneticists)** para participar en el evento de Atención Primaria en Países en Desarrollo y el Congreso Internacional de Genética Humana. Montreal, Canadá, 10 al 11 de Octubre de 2011.

**4-Mención en el concurso “Rafael Estrada in Memoriam”** durante el III Simposio Internacional de Ataxias Hereditarias. Holguín, 1 al 3 de Octubre de 2008.

**IIIb-) Premios nacionales (Total 4).**

**1-Mención en la XIII Exposición Nacional “Forjadores del Futuro”.** Holguín, 24 de Septiembre de 2009.

**2-Sello “Forjadores del Futuro”** en los años 2008 y 2010.

**3-Medalla “Abel Santamaría”.**

**IIIc-) Premios provinciales (Total: 3).**

**1-Primeras familias cubanas con diagnóstico molecular de Ataxia de Friedreich. Destacado.** XVI Fórum de Ciencia y Técnica 2da Etapa. CIRAH, 23 de Mayo de 2008.

**2-Familias cubanas afectadas por ataxias hereditarias como candidatas al DGPI. Relevante.** Exposición "Forjadores del Futuro". CIRAH, 24 de Abril de 09.

**3-Gen FRDA en la población cubana. Relevante.** Evento de mujeres creadoras. CIRAH, 4 de Noviembre de 2009.

#### **IV. CURSOS Y ENTRENAMIENTOS IMPARTIDOS RELACIONADOS CON LA TESIS (Total 8).**

##### **IVa-) Cursos internacionales (Total: 4).**

1-Tercer Curso Internacional del Caribe sobre las Bases Moleculares y Neurofisiológicas de Enfermedades Neurodegenerativas debidas a Expansiones Poliglutamínicas. Holguín, Abril de 2009. **4 horas impartidas.**

2-Curso Internacional "Genética médica, enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas". Colegio Médico, Holguín, Febrero a Junio de 2009. **40 horas impartidas.**

3-Curso Precongreso "Dilemas Éticos en las Neurociencias". Conferencia "El diagnóstico predictivo en las ataxias hereditarias". Congreso Internacional de Neurología y Neurocirugía NEUROCUBA 2009. Ciudad Habana, 13 Abril de 2009. **2 horas impartidas.**

4-IBRO IV International Course on Neurodegenerative Diseases. "Molecular Basis of Neurodegeneration". Holguín, 13-14 abril del 2010. **4 horas impartidas.**

##### **IVb-) Cursos provinciales (Total: 4).**

1-Curso de Postgrado "Actualización en Genética". Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello", Holguín, Diciembre de 2005. **24 horas impartidas.**

2-Curso de Postgrado "Bases genéticas de la SCA2 y la Ataxia de Friedreich". CIRAH, 18 de abril a 8 de Junio de 2007. **40 horas impartidas.**

**3**-Curso de postgrado “Caracterización genotípica y fenotípica de las Ataxias Hereditarias Espinocerebelosas”. Facultad de Ciencias Médicas “Mariana Grajales Coello”, Holguín, Marzo de 2008. **40 horas impartidas.**

**4**-Diplomado “Mínimo de Especialidad Clínica Médica”. Módulo de Genética Humana. Colegio Médico, Holguín, Septiembre a Diciembre de 2010. **40 horas impartidas.**

**V. CURSOS DE POSTGRADO RECIBIDOS EN RELACIÓN CON LA TESIS (Total: 13).**

**Va-) Cursos internacionales (Total: 5).**

1-X Curso Internacional Teórico Práctico de Biología Molecular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad Habana, Junio del 2000. **60 horas.**

2-Epidemiología Genética. Curso precongreso durante el Primer Congreso Internacional de Genética Comunitaria. Ciudad Habana, 12 de Mayo de 2006. **2 horas.**

3-Avances en Genética Molecular. Curso precongreso durante el Primer Congreso Internacional de Genética Comunitaria. Ciudad Habana, 12 de Mayo de 2006. **2 horas.**

4-V Curso de la Escuela Latinoamericana de Genética Médica y Humana. Caxias do Sul, Brasil, 10 al 16 de Mayo de 2009. **40 horas.**

5-Curso Básico de Trastornos del Movimiento. Toronto, Canadá, Junio de 2011. **8 horas.**

**Vb-) Cursos nacionales (Total: 4).**

1-Curso Básico de Biología Molecular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad Habana, Octubre a Diciembre de 2000. **40 horas.**

2-Curso Avanzado de Biología Molecular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad Habana, Mayo a Septiembre de 2001. **79 horas.**

**3-**Actualización en Biología Molecular. Curso precongreso durante la Cuarta Jornada Nacional de Genética Médica. Centro Nacional de Genética Médica. Ciudad Habana, Diciembre de 2004. **4 horas.**

**4-**Taller Nacional de Epidemiología Genética. Centro Nacional de Genética Médica. Ciudad Habana, Marzo de 2007. **40 horas.**

**Vc-) Cursos provinciales (Total: 4).**

**1-**Curso de postgrado “Actualización en genética general y molecular”. Facultad de Ciencias Médicas “Mariana Grajales Coello”, Holguín, Diciembre de 1999. **40 horas.**

**2-**Curso de postgrado “Introducción al mapeo de genes en enfermedades complejas”. Centro Nacional de Genética Médica. Ciudad Habana, Julio de 2002. **40 horas.**

**3-**Curso de postgrado “Caracterización genotípica y fenotípica de las Ataxias Hereditarias Espinocerebelosas”. Facultad de Ciencias Médicas “Mariana Grajales Coello”, Holguín, Marzo de 2008. **148 horas.**

**4-**Diplomado “Mínimo de la Especialidad Clínica Médica”. Facultad de Ciencias Médicas “Mariana Grajales Coello”, Holguín, Abril de 2010. **40 horas.**