

UNIVERSIDAD MÉDICA DE HOLGUÍN
CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN Y REHABILITACIÓN DE LAS ATAXIAS
HEREDITARIAS (CIRAH) “CARLOS J. FINLAY”

FACTORES GENÉTICOS Y FISIOLÓGICOS MODIFICADORES
DEL FENOTIPO CLÍNICO EN FAMILIAS CUBANAS CON ATAXIA
ESPINOCEREBELOSA TIPO 2

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

Luis Enrique Almaguer Mederos

Holguín

2010

UNIVERSIDAD MÉDICA DE HOLGUÍN
CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN Y REHABILITACIÓN DE LAS ATAXIAS
HEREDITARIAS (CIRAH) “CARLOS J. FINLAY”

FACTORES GENÉTICOS Y FISIOLÓGICOS MODIFICADORES
DEL FENOTIPO CLÍNICO EN FAMILIAS CUBANAS CON ATAXIA
ESPINOCEREBELOSA TIPO 2.

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

Autor: Prof. Asistente, Lic. Luis Enrique Almaguer Mederos.

Tutores: Prof. Tit., Lic. Jorge Aguiar Santiago, DrC.

Prof. Tit., Dr. Luis Velázquez Pérez, DrC.

Holguín

2010

*Todo es eterno y constante,
Todo es música y razón,
Y todo como el diamante,
Antes que luz es carbón.*

José Julián Martí Pérez

AGRADECIMIENTOS

Ante todo a mis padres, Mirtha y Luis, formadores desde siempre de valores y actitudes imprescindibles para una existencia útil. A mi hermano David con la certeza de la victoria. A mi Yulemis y a Pili, indispensables en mi viaje por la vida. A todos los que contribuyeron a mi formación humana, profesional y académica a lo largo de los años: a Martha, Olga Lidia, Proenza, Began, Manuel, Gerardo, a Mariño y Nora. A mis profesores de siempre: Lilita, Ana María, Jorge Sierra, Carlos Naranjo, Mireya. A Bernardo, profesor y amigo. A mis compañeros de estudios universitarios: Yoira, Ronal, Ediliuska, Sara Ilse, Aurora, Tomás, Yobanis y Yoadris especialmente y a todos los otros. A mis tutores por la guía en la elaboración de este documento. A mis compañeros de laboratorio por ayudarme a sacar adelante este proyecto: Yanetza, Dennis, Dany, José, también a Yobanis y a Sandor, y más recientemente a Yaimé y Pedro. A mis compañeros de trabajo pasados y presentes, especialmente a Julio, Nalia, Roberto, Tania, Raulito, Gilberto, Yaumara, Humberto, Karel y Mercedes. A Raúl de Zayas y a los compañeros del Departamento de Investigaciones de la Universidad Médica de Holguín, especialmente a Pablo Bahr, por su ayuda incondicional. A Ángel Sánchez por sus sabios consejos. A mis estudiantes por sus preguntas inteligentes. A los amigos de siempre y a los que vendrán.

SÍNTESIS

Dada la gran variabilidad del fenotipo clínico en individuos con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), se realizó un estudio transversal con el objetivo de caracterizar la relación existente entre factores genéticos y fisiológicos, y el fenotipo clínico en familias cubanas con esta enfermedad. Se partió de una muestra integrada por 1745 enfermos o con elevado riesgo. Los estudios moleculares se realizaron por PCR, RFLP y electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida. Se confirmó que el umbral patológico para el gen *sca2* en la población cubana afectada por la enfermedad es de 32 repeticiones de CAG. Se definieron por primera vez rangos de alelos intermedios (25-31 CAGs), y de penetrancia incompleta (32-36 CAGs), y completa (≥ 37 CAGs) para los alelos *sca2*. Se evidenció que el sexo y la edad conceptiva del progenitor transmisor de la mutación influyen sobre la inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos. Se demostró que el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos es el principal determinante del fenotipo clínico en la SCA2 y que los alelos *sca2*, *sca3* y *drpla* normales, y el polimorfismo mitocondrial 10398G, así como el sexo y el tiempo de evolución de la enfermedad, modifican la expresividad variable del fenotipo clínico.

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
1. INTRODUCCIÓN	<i>1</i>
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	<i>6</i>
2.1 Las Ataxias Cerebelosas Autosómico Dominantes.	<i>6</i>
2.2 Enfermedades neurodegenerativas humanas causadas por mutaciones dinámicas.	<i>6</i>
2.3 Enfermedades poliglutamínicas humanas.	<i>7</i>
2.3.1 Rangos de referencia según la significación clínica de alelos con diferente longitud de su secuencia repetitiva de CAG.	<i>8</i>
2.3.2 Inestabilidad intergeneracional de alelos expandidos y anticipación genética en enfermedades poliglutamínicas.	<i>9</i>
2.3.3 Mecanismos patofisiológicos asociados a las enfermedades poliglutamínicas.	<i>10</i>
2.3.1.1 ¿Ganancia o pérdida de función?	<i>10</i>
2.3.1.2 ¿Cuál es la función tóxica asociada a las proteínas poliglutamínicas expandidas?	<i>10</i>
2.3.4 Alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades poliglutamínicas.	<i>12</i>
2.4 La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	<i>13</i>
2.4.1 Epidemiología.	<i>13</i>
2.4.2 Hallazgos clínicos.	<i>14</i>
2.4.3 Hallazgos neurofisiológicos.	<i>14</i>
2.4.4 Anatomía patológica.	<i>15</i>

2.4.5	Genética clásica y molecular.	15
2.4.5.1	Rangos de referencia según la significación clínica de alelos con diferente longitud de su secuencia repetitiva de CAG.	16
2.4.5.2	Inestabilidad intergeneracional de alelos expandidos y anticipación genética.	16
2.4.5.3	La ataxina-2. Patrón de expresión y función fisiológica.	17
2.4.6	Correlaciones genotipo-fenotipo.	18
2.4.6.1	Genes modificadores de la edad de inicio.	19
2.4.7	Mecanismos patofisiológicos asociados a la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	21
2.4.8	Alternativas terapéuticas para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	21
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1	Diseño metodológico.	23
3.2	Población fuente.	23
3.3	Variación del número de repeticiones de CAG y umbral patológico del gen <i>sca2</i> .	23
3.3.1	Sujetos estudiados.	23
3.3.2	Técnicas y procedimientos empleados.	24
3.3.2.1	Estudio genealógico.	24
3.3.2.2	Diagnóstico clínico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	24
3.3.2.3	Obtención y conservación de muestras de sangre.	24
3.3.2.4	Extracción de ADN genómico.	25

3.3.2.5	Determinación de la concentración y pureza del ADN.	25
3.3.2.6	Reacción en cadena de la polimerasa.	25
3.3.2.7	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	25
3.3.2.8	Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida.	26
	Análisis automático de fragmentos de ADN y estimación del número de repeticiones de CAG en el gen SCA2.	
3.3.2.9	Secuenciación del fragmento repetitivo de CAG del gen SCA2.	27
3.3.3	Variables analizadas.	28
3.4	Penetrancia de alelos SCA2 expandidos.	28
3.4.1	Sujetos estudiados.	28
3.4.2	Técnicas y procedimientos empleados.	28
3.4.3	Variables analizadas.	28
3.5	Inestabilidad intergeneracional de alelos <i>sca2</i> normales largos.	28
3.5.1	Sujetos estudiados.	29
3.5.2	Técnicas y procedimientos empleados.	29
3.5.3	Variables analizadas.	29
3.6	Inestabilidad intergeneracional de alelos <i>sca2</i> expandidos.	29
3.6.1	Sujetos estudiados.	30
3.6.2	Técnicas y procedimientos empleados.	30
3.6.3	Variables analizadas.	30
3.7	Edad de inicio y del riesgo bayesiano dependiente de la edad.	30
3.7.1	Sujetos estudiados.	30
3.7.2	Técnicas y procedimientos empleados.	31
3.7.3	Variables analizadas.	31

3.8 Influencia del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos sobre el fenotipo clínico de la enfermedad.	31
3.8.1 Sujetos estudiados.	32
3.8.2 Técnicas y procedimientos empleados.	32
3.8.2.1 Evaluación clínica de individuos enfermos con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	32
3.8.2.2 Estudio electrofisiológico de la velocidad sacádica.	32
3.8.2.2.1 Registro electronistagmográfico.	32
3.8.2.2.2 Análisis de las sácadas.	33
3.8.2.3 Técnicas y procedimientos empleados en los estudios moleculares.	33
3.8.3 Variables analizadas.	34
3.9 Influencia del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> normales y del genotipo <i>sca2</i> sobre el fenotipo clínico de la enfermedad.	34
3.9.1 Sujetos estudiados.	34
3.9.2 Técnicas y procedimientos empleados.	34
3.9.3 Variables analizadas.	34
3.10 Influencia de la dosis genética sobre el fenotipo clínico de la enfermedad.	35
3.10.1 Sujetos estudiados.	35
3.10.2 Técnicas y procedimientos empleados.	35
3.10.3 Variables analizadas.	35
3.11 Componentes genético y ambiental de la varianza residual de la edad de inicio.	35

3.11.1	Sujetos estudiados.	36
3.11.2	Técnicas y procedimientos empleados.	36
3.11.3	Variables analizadas.	36
3.12	Genes candidatos a modificadores del fenotipo clínico de la enfermedad.	37
3.12.1	Sujetos estudiados.	
3.12.2	Técnicas y procedimientos empleados.	
3.12.3	Variables analizadas.	
3.13	Procesamiento estadístico de la información.	37
3.14	Aspectos éticos de la investigación.	42
4.	RESULTADOS	43
4.1	Variación del número de repeticiones de CAG del gen <i>sca2</i> en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Rangos de referencia.	43
4.1.1	Umbral patológico y frecuencias génicas y genotípicas para el gen <i>sca2</i> .	43
4.1.2	Penetrancia de alelos <i>sca2</i> expandidos.	46
4.1.3	Inestabilidad intergeneracional de alelos <i>sca2</i> normales largos. Mutaciones <i>de novo</i> .	47
4.1.4	Inestabilidad intergeneracional de los alelos <i>sca2</i> expandidos.	48
4.1.4.1	Efecto del número de repeticiones de CAG de los alelos <i>sca2</i> expandidos transmitidos y de la edad conceptiva sobre la inestabilidad intergeneracional.	49
4.1.4.2	Efecto del sexo de los descendientes sobre la inestabilidad intergeneracional de los alelos <i>sca2</i> expandidos.	51

4.1.4.3 Familiaridad de la inestabilidad intergeneracional de los alelos <i>sca2</i> expandidos.	52
4.2 Edad de inicio y riesgo bayesiano dependiente de la edad.	52
4.2.1 Riesgo bayesiano dependiente de la edad para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	53
4.3 Factores genéticos y fisiológicos que modifican el fenotipo clínico de la enfermedad.	55
4.3.1 Fenotipo clínico y número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos.	55
4.3.1.1 Edad de inicio de la enfermedad <i>versus</i> número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos.	55
4.3.1.1.1 Probabilidad de enfermar a una edad determinada para un número de repeticiones de CAG específico en alelos <i>sca2</i> expandidos.	56
4.3.1.2 Duración de la vida y duración de la enfermedad <i>versus</i> número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos.	58
4.3.1.3 Puntuación total de ataxia <i>versus</i> número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos.	59
4.3.1.4 Velocidad sacádica máxima y latencia sacádica <i>versus</i> número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos.	60
4.3.1.5 Tasa de progresión de la enfermedad <i>versus</i> número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos.	61
4.3.2 Influencia del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i>	62

normales y del genotipo <i>sca2</i> sobre el fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	
4.3.3 Efecto de la dosis genética sobre el fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	64
4.3.4 Componentes genético y ambiental de la varianza residual de la edad de inicio.	66
4.3.5 Genes modificadores del fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	67
5. DISCUSIÓN	71
5.1 Variación del número de repeticiones de CAG del gen <i>sca2</i> en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Rangos de referencia.	71
5.1.1 Umbral patológico y frecuencias génicas y genotípicas para el gen <i>sca2</i> .	72 73
5.1.2 Penetrancia de alelos <i>sca2</i> expandidos.	
5.1.3 Inestabilidad intergeneracional de alelos normales largos. Mutaciones <i>de novo</i> .	75
5.1.4 Inestabilidad intergeneracional de los alelos <i>sca2</i> expandidos.	
5.2 Edad de inicio y riesgo bayesiano dependiente de la edad para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	78
5.3 Factores genéticos y fisiológicos modificadores del fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	79
5.3.1 Fenotipo clínico y número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos.	79
5.3.1.1 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos	79

<i>sca2</i> expandidos sobre la edad de inicio de la enfermedad.	
5.3.1.1.1 Probabilidad de enfermar a una edad determinada para un número de repeticiones de CAG específico en alelos <i>sca2</i> expandidos.	81
5.3.1.2 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos sobre la duración de la vida y duración de la enfermedad.	82
5.3.1.3 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos sobre la puntuación total de ataxia.	83
5.3.1.4 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos sobre la velocidad sacádica máxima y la latencia sacádica.	83
5.3.1.5 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> expandidos sobre la tasa de progresión de la enfermedad.	84
5.3.2 Efectos del número de repeticiones de CAG en alelos <i>sca2</i> normales y del genotipo SCA2 sobre el fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	
5.3.3 Efecto de la dosis genética sobre el fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	87
5.3.4 Heredabilidad de la varianza residual de la edad de inicio.	89
5.3.5 Genes modificadores del fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	90
5.3.6 Interfaz genotipo-ambiente-fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	93

5.4 Aproximación teórica a los mecanismos patológicos y estrategias terapéuticas potenciales para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.	94
5.4.1 Plegamiento inapropiado y agregación de la ataxina-2.	95
5.4.2 ¿Desregulación transcripcional en la SCA2?	96
5.4.3 Estrategias terapéuticas potenciales para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2: de lo básico a lo clínico.	97
CONCLUSIONES	98
RECOMENDACIONES	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	
AUTOBIBLIOGRAFÍA	

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las Ataxias Cerebelosas Autosómico Dominantes forman un grupo heterogéneo de afecciones neurodegenerativas. Se caracterizan por la pérdida neuronal progresiva a nivel del cerebelo, núcleos del tallo cerebral y tractos espinocerebelosos. Sus principales manifestaciones clínicas son la ataxia de la marcha, disimetría, disartria y adiadococinesia (1).

Se han identificado 28 formas moleculares diferentes de ataxias espinocerebelosas (SCA1...SCA28, *por sus siglas en inglés*). Como grupo tienen una prevalencia mundial de 1-4 cada 10^5 habitantes, aunque puede ser mucho mayor en regiones específicas debido a un efecto fundador (2). Tal es el caso de la SCA3 en las islas Azores de Portugal (3), y de la SCA2 en Cuba (4).

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 alcanza la más elevada tasa de prevalencia a nivel mundial en la provincia Holguín: 40.18 cada 10^5 habitantes (5). La SCA2 es la segunda entre las SCA con mayor prevalencia a nivel mundial, y es la más frecuente en el centro y sur de Italia (6), en el norte de Europa (7), en la India (8), y en Singapur (9), si bien en estas regiones alcanza tasas de prevalencia mucho menores que en Holguín. Por ejemplo, en Singapur la SCA2 alcanza una prevalencia de tan solo 1.08 cada 10^5 habitantes (9).

La mutación causante de varias de estas ataxias (SCA1, 2, 3, 6, 7 y 17) consiste en la expansión de una secuencia repetitiva de CAG, que es traducida para dar lugar a proteínas con dominios poliglutamínicos expandidos o asociados con la patología, que le confieren la ganancia de una nueva función a la proteína patológica, y que son tóxicas para poblaciones neuronales específicas. Estas características las agrupan, junto a la enfermedad de Huntington, la Atrofia Muscular Espinobulbar, y la Atrofia Dentatorubral-Páldidoluysiana, bajo la denominación de “enfermedades poliglutamínicas”. Para ninguna de estas enfermedades existe alguna terapia de probada efectividad (10). En particular, el producto génico del gen *sca2* expandido, la ataxina-2

patológica, es preferentemente tóxico para las neuronas de Purkinje de la corteza cerebelosa. La función fisiológica de la ataxina-2 nativa está vinculada al metabolismo de ARNs y a la regulación traduccional (11).

El fenotipo clínico de la SCA2 es muy variable y guarda un vínculo complejo con el genotipo. La repetición de CAG cuya expansión causa la SCA2, está situada en el exón 1 del gen *sca2*, y normalmente es polimórfica en un rango de repeticiones no asociadas con el fenotipo clínico de la enfermedad (13-30 CAG) (12). Esta solo se manifiesta cuando el gen sobrepasa un umbral crítico de 32-33 repeticiones de CAG, y se ha sugerido que los alelos con 32 a 35 unidades de CAG pueden mostrar una penetrancia incompleta (13). Adicionalmente, para varias enfermedades poliglutamínicas se ha establecido un rango de alelos intermedios, con una mayor tendencia a la expansión que lo normal, que pueden dar lugar a nuevas familias afectadas a través de mutaciones *de novo* (14).

Al tratarse de enfermedades autosómico dominantes, se espera que cada descendiente directo de un enfermo tenga un riesgo del 50% de heredar la mutación. Sin embargo, en la enfermedad de Huntington y la SCA3, este riesgo disminuye con el avance de la edad (15, 16). Así, por ejemplo, cada descendiente directo de un individuo con la enfermedad de Huntington, tiene un riesgo del 48% a los 30 años de edad, del 43% a los 40 años, y del 32% a los 50 años de edad (15). Para la SCA2 no existen estudios que exploren la relación entre el riesgo de heredar la mutación y la edad del individuo en riesgo. La necesidad de resolver esta situación problemática cobra especial importancia en la población cubana afectada por la SCA2, dado el gran número registrado de individuos en riesgo de enfermar, y debido a que se espera que una estimación más exacta del riesgo de heredar la mutación contribuya a lograr un asesoramiento genético más efectivo.

Se ha comprobado que los alelos *sca2* expandidos influyen sobre la edad de inicio de la enfermedad, y que tienen una tendencia a sufrir nuevas expansiones durante su transmisión intergeneracional, lo que da explicación a la presentación clínica de la enfermedad cada vez más

tempranamente en sucesivas generaciones de las familias afectadas, fenómeno conocido como “anticipación genética” (17). La inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG del gen *sca2* parece depender de la longitud de la secuencia repetitiva de CAG, y de factores fisiológicos como el sexo y la edad conceptiva del progenitor transmisor de la mutación (18). Por otra parte, la edad de inicio es muy variable incluso entre individuos con igual número de repeticiones de CAG en sus alelos *sca2* expandidos, lo que evidencia la expresividad variable del fenotipo clínico en la SCA2. Estas observaciones sugieren la existencia de factores genéticos adicionales al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos que, en interacción con factores fisiológicos y del ambiente externo, modifican el fenotipo clínico de la enfermedad. Entre los factores genéticos adicionales propuestos como modificadores del fenotipo clínico se encuentran el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales, la doble dosis genética, la existencia de patrones de metilación diferenciales o de mutaciones puntuales en la región promotora del gen *sca2* que afecten los niveles de expresión del gen, otros polimorfismos intragénicos de un solo nucleótido, y otros genes independientes al gen causante de la enfermedad, denominados genes modificadores (19-21). Hasta la fecha se han identificado los genes *rail* y *sca6* como modificadores de la edad de inicio en la SCA2 (21, 22).

La identificación de nuevos factores genéticos y fisiológicos con influencia sobre el fenotipo clínico de la enfermedad tiene gran importancia para el desarrollo de modelos predictivos, para la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el proceso patológico, y para la identificación de dianas farmacológicas y la proposición de estrategias terapéuticas.

El presente trabajo parte de la siguiente **Hipótesis:**

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 es una enfermedad genética causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG que muestra gran variabilidad alélica asociada a la severidad clínica de la enfermedad, y que alcanza en nuestro país las mayores tasas de incidencia y prevalencia a nivel mundial. Por tanto, se pueden definir rangos de referencia para la población cubana afectada por esta enfermedad, según el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales

y expandidos, así como identificar nuevos factores genéticos y fisiológicos con influencia sobre el fenotipo clínico.

Con la finalidad de evaluar la validez de la hipótesis se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Caracterizar la relación existente entre factores genéticos y fisiológicos, y el fenotipo clínico en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

Objetivos específicos

- 1- Definir rangos de referencia de acuerdo a la significación clínica de los alelos del gen *sca2* según la longitud de su secuencia repetitiva de CAG.
- 2- Caracterizar la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG en alelos *sca2* expandidos.
- 3- Obtener estimados probabilísticos del riesgo de heredar la mutación y de la edad de inicio de la enfermedad.
- 4- Evaluar la influencia de factores genéticos y fisiológicos sobre el fenotipo clínico.

Esta tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas se estructuró en cinco capítulos: Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Además se presentan seis secciones: Síntesis, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas, Anexos y Autobiografía.

La **novedad científica** de la presente investigación consiste en que se definen, por primera vez en el ámbito internacional, rangos de penetrancia incompleta (32-36 repeticiones de CAG) y completa (37-79 repeticiones de CAG), y de alelos intermedios (25-31 repeticiones de CAG) para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2; la definición del rango de alelos intermedios implicó la extensión del rango de repeticiones de CAG no relacionadas con el fenotipo clínico en el locus *sca2*, que es susceptible de sufrir inestabilidad intergeneracional hasta alcanzar el umbral patológico. Se encontró la mayor variabilidad alélica y genotípica del mundo para la SCA2 y se lograron identificar nuevos factores genéticos y fisiológicos que influyen sobre la inestabilidad

intergeneracional de alelos *sca2* expandidos. También se lograron identificar por primera vez en el ámbito internacional, al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2*, *sca3* y *drpla* normales, y el polimorfismo mitocondrial 10398G como modificadores del fenotipo clínico.

El **aporte teórico** del presente estudio es que profundiza en el conocimiento de las bases genéticas de la SCA2, enriqueciendo la comprensión de la penetrancia de los alelos *sca2* expandidos, y de la inestabilidad intergeneracional de los alelos *sca2* normales y expandidos. Se profundiza en el conocimiento de la influencia de los componentes genéticos y del ambiente interno de los individuos sobre el fenotipo clínico de la enfermedad y se identifican nuevos determinantes del mismo.

El **aporte práctico** de la presente investigación consiste en que los resultados que se presentan pueden ser utilizados para el asesoramiento genético que se ofrece a los individuos en riesgo, involucrados en el Programa Nacional para el Diagnóstico Predictivo de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Además, se brinda información acerca de la probabilidad de manifestar la SCA2 a una edad determinada para un número de repeticiones de CAG específico, que podría ser empleada para mejorar el diseño de ensayos clínicos en busca de opciones terapéuticas.

Los resultados presentados y discutidos en esta tesis forman parte de un trabajo publicado en la revista “Archive of Neurology”, de otros dos publicados en la revista “Clinical Genetics”, ambas asentadas en el “Science Citation Index”, y de otro publicado en la Revista Cubana de Genética Comunitaria. Estos resultados también se han expuesto en un total de 44 eventos científicos (24 Internacionales, 6 Nacionales y 14 Provinciales), y han sido merecedores de 30 Premios y Distinciones Científico-Técnicas.

La predefensa y defensa de esta tesis se realizaron ante el Consejo Científico de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Las Ataxias Cerebelosas Autosómico Dominantes

Las Ataxias Cerebelosas Autosómico Dominantes (ADCA, *del inglés: Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias*) constituyen un grupo, clínica y genéticamente, heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por una ataxia progresiva, variablemente asociada a otros signos neurológicos, y causadas por una degeneración progresiva del cerebelo y del tallo cerebral (1, 6). Se han identificado 28 formas moleculares diferentes de ataxias espinocerebelosas (*SCA1...SCA28, por sus siglas en inglés*), que se clasifican en cuatro grupos atendiendo a sus características clínicas (23) (Anexo 1). Se estima que aún queda alrededor de un 20-30% de las ataxias espinocerebelosas por identificar (2, 24).

Como grupo, las ADCA tienen una prevalencia mundial estimada de 1-4/100 000 habitantes, aunque puede ser mucho mayor en regiones específicas debido a un efecto fundador (2). Tal es el caso de la SCA3 en las islas Azores, Portugal (3), y de la SCA2 en Holguín, Cuba (4). La mutación genética causante de varias de estas ataxias consiste en la expansión de secuencias repetitivas de CAG/CTG o de ATTCT/AGAAT que muestran inestabilidad intergeneracional y somática (25, 26). Por esta razón han sido agrupadas, junto a otras enfermedades con la misma característica, bajo la denominación de enfermedades causadas por mutaciones dinámicas.

2.2 Enfermedades neurodegenerativas humanas causadas por mutaciones dinámicas

La inestabilidad en secuencias repetitivas de ADN no fue asociada a enfermedades hasta el descubrimiento de que la atrofia muscular espino-bulbar (SBMA) y el síndrome del Frágil-X eran causados por expansiones de trinucleótidos repetidos en tándem (27, 28). La identificación de enfermedades adicionales ha conducido al reconocimiento de dos grupos:

1. Enfermedades causadas por expansiones en secuencias trinucleotídicas o pentanucleotídicas repetitivas localizadas en regiones no codificadoras de genes no-veles.

Aquí se encuentran las expansiones de los trinucleótidos GGC y GCC en los síndromes del cromosoma X-frágil (28, 29), la expansión del trinucleótido CTG en la Distrofia Miotónica (30) y en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 8 (SCA8) (31), la expansión del trinucleótido GAA en la Ataxia de Friedreich (32), la expansión del pentanucleótido ATTCT en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 10 (SCA10) (33), y la expansión del trinucleótido CAG en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 12 (SCA12) (34).

2. Enfermedades causadas por repeticiones de CAG localizadas en la región codificadora de sus respectivos genes, y que son traducidas para dar lugar a proteínas con dominios poliglutamínicos expandidos (enfermedades poliglutamínicas).

2.3 Enfermedades poliglutamínicas humanas

Este grupo de dolencias incluye a la enfermedad de Huntington (HD, *del inglés: Huntington's disease*) (35), la Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA, *del inglés: Spinal and Bulbar Muscular Atrophy*) (27), la Atrofia Dentatorubral-Páldoluisiana (DRPLA, *del inglés: Dentatorubral pallidoluysian atrophy*) (36), y a las Ataxias Espinocerebelosas (SCA) tipo 1 (37), tipo 2 (38-40), tipo 3 -o enfermedad de Machado-Joseph (MJD, *del inglés: Machado-Joseph disease*)- (41), tipo 6 (42), tipo 7 (43) y tipo 17 (44).

Estas enfermedades se caracterizan por la manifestación de la sintomatología clínica una vez que la secuencia repetitiva de CAG se haya expandido por encima de cierto valor umbral. Cada una sigue un patrón neuropatológico específico a pesar de que las proteínas causales son expresadas de modo ubicuo, muestran inclusiones citoplasmáticas o intranucleares como característica histopatológica unificadora, y son eminentemente neurológicas. Adicionalmente, muestran inestabilidad intergeneracional y somática de la secuencia repetitiva de CAG con una tendencia a la expansión, que se expresa clínicamente en forma de anticipación genética. Dada la comunidad de rasgos que caracterizan a las enfermedades poliglutamínicas, se presume que compartan mecanismos patofisiológicos similares (45, 46).

2.3.1 Rangos de referencia según la significación clínica de alelos con diferente longitud de su secuencia repetitiva de CAG

Para las enfermedades poliglutamínicas se han definido rangos de referencia de acuerdo al número de repeticiones de CAG en los genes causales (Anexo 2). En estas enfermedades la manifestación de la sintomatología clínica ocurre una vez que la secuencia repetitiva de CAG se haya expandido por encima de cierto valor. Este valor se conoce como “umbral patológico” y se emplea para definir los rangos normal y patológico para cada una de estas enfermedades. En la mayoría de las enfermedades poliglutamínicas, el umbral patológico se encuentra entre las 30 y 50 repeticiones de CAG, con la excepción de la SCA6 que requiere un mínimo de 21 repeticiones de CAG para producir la manifestación de la enfermedad (47).

El rango de “alelos intermedios” -o “alelos normales mutables”- es aquel a partir del cual surgen nuevas mutaciones que superan el umbral patológico (mutaciones *de novo*), y está conformado por alelos de longitud mayor a la comúnmente observada en la población general pero más cortos que los observados en enfermos, y encontrados en personas clínicamente normales (48). Para la enfermedad de Huntington, por ejemplo, el rango de alelos intermedios va de 27 a 35 unidades repetitivas de CAG (49, 50). Entre los factores que tienen influencia sobre la probabilidad de que alelos en este rango sufran expansiones durante su transmisión intergeneracional, se encuentra el sexo del progenitor transmisor del alelo intermedio, la longitud de la secuencia repetitiva de CAG, y el patrón de interrupciones de CAA que tenga en su secuencia repetitiva de CAG (49).

También se han definido rangos de “penetrancia incompleta” y “penetrancia completa” para varias enfermedades poliglutamínicas. La penetrancia puede ser definida como la proporción de individuos con un genotipo específico, que muestran el fenotipo esperado bajo un conjunto de condiciones ambientales definidas, como puede ser el tiempo de vida normal expresado como esperanza de vida, entendida como el número medio de años de vida que viviría una persona si se mantuvieran las tasas de mortalidad por edades de ese momento (48). Para la enfermedad de Huntington, por ejemplo, los alelos con 36 a 39 repeticiones de CAG tienen penetrancia

incompleta, mientras que aquellos con alelos con 40 o más repeticiones de CAG muestran una penetrancia completa (51).

2.3.2 Inestabilidad intergeneracional de alelos expandidos y anticipación genética en enfermedades poliglutamínicas

La anticipación genética es un fenómeno característico de las enfermedades poliglutamínicas, y se debe a la confluencia de la relación inversa entre la edad de inicio y el número de repeticiones de CAG en alelos expandidos, y la tendencia de estos últimos a sufrir nuevas expansiones durante su transmisión intergeneracional (52, 53). Entre los factores señalados como influyentes sobre la inestabilidad intergeneracional de alelos expandidos, el sexo del progenitor transmisor de la mutación y el número de repeticiones de CAG en los alelos expandidos transmitidos son los más significativos (54).

La inestabilidad está conectada intrínsecamente con la longitud de la secuencia repetitiva; solo secuencias por encima de cierto umbral de estabilidad (~34 repeticiones de CAG) se vuelven inestables (52). No obstante, las evidencias obtenidas a partir de estudios en humanos resultan contradictorias. En individuos con SCA3 se ha revelado que durante las transmisiones paternas fueron los alelos expandidos más pequeños los más inestables (55). Para la SCA1 y la Atrofia Muscular Espinobulbar no se ha encontrado asociación significativa entre la longitud de la secuencia repetitiva de CAG y su inestabilidad intergeneracional (52). Para la enfermedad de Huntington, estudios recientes han demostrado que secuencias repetitivas más largas son más inestables en su transmisión intergeneracional (56-58).

Adicionalmente, se ha planteado que la edad conceptiva del progenitor transmisor de la mutación, el sexo del descendiente, y factores genéticos *cis*- y *trans*-actuantes adicionales al número de repeticiones de CAG del progenitor transmisor de la mutación, están involucrados en la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG en alelos expandidos (56). También se ha demostrado la influencia del producto de los genes *Msh2*, *Msh3* y *Pms2*, involucrados en rutas de reparación de ADN, y de factores tales como la pureza del segmento

repetitivo, secuencias flanqueantes, nucleosomas, y la metilación de islotes de CpG, sobre la inestabilidad de secuencias repetitivas de CAG, y se han identificado modificadores químicos de la dinámica de la inestabilidad de estas secuencias, lo que tiene potencialidades terapéuticas (53, 59).

2.3.3 Mecanismos patofisiológicos asociados a las enfermedades poliglutamínicas

2.3.3.1 ¿Ganancia o pérdida de función?

Las enfermedades asociadas a proteínas mutantes pueden reflejar una pérdida de la función normal, la ganancia de una nueva función tóxica, o ambas. Varias evidencias sugieren que la expansión de secuencias proteicas poliglutamínicas implica una ganancia de función que resulta deletérea para subpoblaciones neuronales específicas. Así, la presencia de una secuencia poliglutamínica expandida parece suficiente para provocar neurodegeneración, si bien es el contexto proteico del dominio poliglutamínico el que determina la selectividad de la pérdida neuronal característica de cada enfermedad (60, 61). También se ha revelado que modelos transgénicos que expresan ataxina-1 o ataxina-2 expandidas manifiestan signos de degeneración muy similares a lo observado en humanos (62-64). Sin embargo, modelos “*knock-out*” que carecen de ataxina-1 o ataxina-2 nativas, son viables y no desarrollan ataxia (11, 62, 65). No obstante, al menos para la huntingtina y la atrofina-1 se ha demostrado que la expansión de la secuencia poliglutamínica también implica una pérdida de función (66, 67).

El que monómeros de las proteínas poliglutamínicas nativas sean secuestrados en los agregados formados por proteínas con dominio poliglutamínico expandido en varias de estas enfermedades, ha sugerido que las proteínas mutantes también actúan a través de un efecto negativo dominante al interferir con la función de las proteínas nativas. Este efecto podría dar lugar a las características específicas de cada enfermedad (46, 68).

2.3.3.2 ¿Cuál es la función tóxica asociada a las proteínas poliglutamínicas expandidas?

Se han propuesto varios mecanismos patogénicos para las enfermedades poliglutamínicas, entre los que se encuentran: estrés oxidativo y trastornos del metabolismo energético (69-71), excitotoxicidad y neurotransmisión (72), activación de caspasas y apoptosis (71, 73),

desregulación transcripcional (74), disminución de factores neurotróficos (75, 76), inhibición del transporte axonal rápido (77, 78), y el plegamiento inapropiado y agregación de las proteínas mutadas (61, 79, 80).

Quizás el mecanismo patogénico más aceptado sea el del plegamiento inapropiado y agregación de las proteínas mutadas (81). En efecto, existe una notable correlación entre el umbral necesario para la ocurrencia de agregación *in vitro*, y el necesario para la manifestación de la enfermedad en el ser humano. Esto indica que las secuencias con más de 36-40 glutaminas adquieren una tendencia cualitativamente nueva a la agregación (82). Además, en individuos que expresan ataxina-1 expandida cuyo dominio poliglutamínico está interrumpido por histidinas, se ha observado una tendencia menor a la formación de agregados proteicos y ausencia de la enfermedad (83).

No obstante, varios estudios indican que la agregación no es necesaria ni suficiente para provocar disfunción neuronal, y sugieren que los agregados representan un esfuerzo de la célula por cercar la toxicidad (82). En este sentido, estudios realizados en individuos con SCA1 o SCA3, demuestran una mayor preservación del tamaño y forma del núcleo en neuronas pontinas con inclusiones intranucleares visibles, que en aquellas sin inclusiones intranucleares (84). A pesar de lo controvertido del rol fisiológico de las grandes inclusiones poliglutamínicas, en la mayoría de los estudios realizados la reducción de la agregación alivia la neurotoxicidad (61).

Adicionalmente, se ha sugerido que la desregulación transcripcional podría ser un proceso patogénico primario en las enfermedades poliglutamínicas (85). Los agregados poliglutamínicos interactúan con varios factores transcripcionales e interfieren en su normal funcionamiento (86). Se ha demostrado que la actividad histona acetil-transferasa de varios factores transcripcionales está disminuida en modelos animales de enfermedades poliglutamínicas (87).

Sorprendentemente, en modelos celulares y animales de enfermedades poliglutamínicas han sido identificadas varias especies de ARN que actúan como moduladores de la toxicidad de proteínas poliglutamínicas mutadas (88). Entre estas se encuentran el ARN que codifica para la ataxina-3

mutada (89), así como varios ARNs no codificantes entre los que se hallan el ARN hsr ω -n (90, 91), y varios micro-ARN (92, 93). Estos hallazgos añaden un nuevo nivel de complejidad al proceso patológico en las enfermedades poliglutamínicas.

2.3.4 Alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades poliglutamínicas

La identificación de mecanismos patogénicos ha generado pautas para la proposición de alternativas terapéuticas en enfermedades poliglutamínicas. Varios estudios han tratado de prevenir la excitotoxicidad utilizando antagonistas del receptor de N-metil-aspartato (NMDA) como la amantadina (94-96), la ketamina o el baclofeno (97), o el riluzol como inhibidor de la liberación de glutamato (98), con escasos beneficios clínicos.

En modelos animales y en humanos con la enfermedad de Huntington, la administración de agentes farmacológicos con actividad antioxidante, como el ácido ascórbico, ácido α -lipoico, creatina o la coenzima Q10 con remacemida, ha logrado atenuar varios aspectos del fenotipo clínico (99-103).

En modelos animales para la enfermedad de Huntington, el tratamiento con inhibidores de histona deacetilasas ha aliviado el fenotipo de la enfermedad, con un incremento en la supervivencia y en el desempeño motor asociado a un incremento en la acetilación de las histonas (104-106).

El uso de inhibidores de caspasas como el zVAD-fmk (107) o la minociclina (108, 109), demoró la progresión de la enfermedad en un modelo transgénico para la enfermedad de Huntington y en humanos. El tratamiento de ratones transgénicos para la enfermedad de Huntington con ácido tauroursodeoxicólico -ácido biliar con actividad anti-apoptótica-, redujo la atrofia estriatal y la apoptosis (110).

Se han identificado varias sustancias con efectos terapéuticos, que actúan como inhibidores de la agregación de proteínas poliglutamínicas. Entre estos se encuentran la geldanamicina (111), la cistamina (112), la cisteamina (113), el Rojo Congo (114), varios derivados del benzotiazol (115), la trealosa (116), el fosfosal, levonordefrin y el nadolol (117). Se ha demostrado en varios

modelos de enfermedades poliglutamínicas, que la sub-expresión del ARN no codificante hsr ω -n tiene un efecto terapéutico ligado a una sustancial reducción en la agregación de las proteínas poliglutamínicas expandidas (91).

La estimulación de chaperonas moleculares y del sistema ubiquitín-proteasoma (118), el uso de estrategias de ARN interferente (119), de reemplazamiento celular a través del uso de células madre (120), o de intracuerpos (121), han mostrado resultados promisorios para el tratamiento de estas enfermedades.

2.4 La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) es una Ataxia Cerebelosa Autosómico Dominante perteneciente al grupo I de la clasificación de Anita Harding (23), causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG en la región codificadora del gen *sca2*. Este gen es traducido para dar lugar a una proteína poliglutamínica, la ataxina-2.

2.4.1 Epidemiología

Estudios epidemiológicos indican que la SCA2 es la segunda entre las ataxias espinocerebelosas con mayor frecuencia a nivel mundial; representa el 15% de todas las SCA, y el 33% de las SCA debidas a expansiones de secuencias repetitivas de CAG (25). Es muy usual en el centro y sur de Italia (6, 122, 123), en el norte de Europa (7), en la India (8, 124), en Singapur (9), y en México (125). No obstante, las más elevadas tasas de incidencia y prevalencia de la enfermedad a nivel mundial han sido encontradas en la provincia Holguín, donde radica el 70% de los individuos enfermos con SCA2 en el país, para una prevalencia de 40.18 cada 10⁵ habitantes (4, 5); se presume que esta situación se deba a la ocurrencia de un “efecto fundador” (126, 127). El municipio con mayor tasa de prevalencia es Báguanos (141.66 cada 10⁵ habitantes), mientras que el municipio Cacocum tiene la mayor tasa de incidencia de la enfermedad (18,02 cada 10⁵ habitantes); este último también alcanza la más elevada tasa de prevalencia para descendientes en riesgo de enfermar (353,66 cada 10⁵ habitantes). La edad de inicio de la enfermedad

disminuye de generación en generación como consecuencia del fenómeno de anticipación genética (128).

2.4.2 Hallazgos clínicos

La SCA2 tiene un fenotipo clínico muy variable. Los primeros estudios mostraron que la SCA2 es una afección neurodegenerativa caracterizada por ataxia de la marcha acompañada de contracturas musculares dolorosas en miembros inferiores, temblor postural o cinético, disminución del tono muscular y de los reflejos tendinosos, y movimientos oculares anormales con enlentecimiento de los sacádicos que pueden progresar hasta una oftalmoplejía nuclear (126). En algunas familias se ha encontrado una elevada incidencia de signos extrapiramidales, demencia, distonía y corea (17, 129), así como asociación con un fenotipo consistente con un parkinsonismo típico con respuesta a la dopamina (130-132).

La edad de inicio de la enfermedad varía entre los 2 a los 65 años de edad, ocurriendo la muerte entre los 12 y los 25 años después de la manifestación de los primeros síntomas (126). Frecuentemente ocurre pérdida de la memoria verbal, trastornos de la atención y deterioro moderado de la percepción olfativa (133-137). Puede ocurrir distonía cervical con elevada frecuencia (138), y es muy rara la ocurrencia de esquizofrenia, polifagia y obesidad (137, 139). Estas observaciones evidencian la gran variabilidad del fenotipo clínico en la SCA2.

En la actualidad se dispone de dos escalas para la cuantificación del déficit motor en las ataxias: la Escala Cooperativa Internacional para la Evaluación de la Ataxia (ICARS) (140), y la Escala para la Evaluación y Gradación de la Ataxia (SARA, *por sus siglas en inglés*) (141). La ICARS tiene muy buena confiabilidad (142), y se ha demostrado su utilidad para la evaluación y monitoreo de la función motora cerebelosa (143). Por su parte, la SARA es de más fácil aplicación que la ICARS, pero excluye la evaluación de trastornos óculo-motores (144).

2.4.3 Hallazgos neurofisiológicos

Las principales alteraciones neurofisiológicas en la SCA2 consisten en la disminución de la amplitud de los potenciales sensitivos, alteraciones en la morfología y la replicabilidad de los

potenciales evocados somato-sensoriales (PESS), y la disminución de la velocidad sacádica máxima (145-148). También existe disminución en la amplitud del componente P100 en los potenciales visuales evocados, y alteraciones en la excitabilidad de la corteza motora (149).

Se han reportado diversos trastornos del sueño REM en individuos con SCA2, asociados a la degeneración nigroestriatal, talámica y del *locus ceruleus* (150). Durante el sueño pueden manifestarse trastornos motores -movimientos periódicos de las extremidades- que han sugerido la presencia de una disfunción de las vías dopaminérgicas (151).

Se han reportado alteraciones disautonómicas, predominando trastornos vasomotores y de la regulación del apetito y peso corporal, así como la existencia de un estado de hiperactividad simpática progresiva (152-154).

2.4.4 Anatomía patológica

Existe una pérdida marcada de las células de Purkinje en la corteza del paleo y neocerebelo, disminución de las neuronas de la oliva inferior en el tallo cerebral, así como desmielinización severa de los cordones posteriores de la médula espinal, disminución moderada de las neuronas sensitivas, desmielinización de las fibras intraganglionares a nivel de los ganglios dorsales, y una severa afectación de núcleos talámicos (155-158). La progresión neuropatológica presenta un patrón degenerativo disperso, que incluye tempranamente la pérdida de neuronas en la sustancia *nigra*, el estriado, el pálido, e incluso en la neocorteza en etapas más avanzadas. El núcleo dentado no resulta afectado, lo que unido al deterioro de los núcleos pontino y de la oliva, de la sustancia *nigra* y del estriado, parecen ser criterios diagnósticos de importancia para la SCA2 (157). También ha sido reportada la presencia de atrofia de la sustancia blanca del cerebelo y del tallo cerebral asociada a la severidad clínica de la enfermedad (159).

2.4.5 Genética clásica y molecular

La SCA2 sigue un patrón de herencia autosómico dominante al que se suma la anticipación genética como patrón de herencia no mendeliano (39, 126). Es causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG en el locus *sca2* (12q24.1) (38-40, 160).

La región codificadora del gen *sca2* consiste de 4 500 pb, y está dividida en 25 exones que ocupan aproximadamente 130 kb de ADN genómico (161). El promotor fisiológico del gen está incluido dentro de un islote de CpG típico, que se extiende desde parte de las regiones 5' UTR del gen, hasta parte de las secuencias del exón 1. Esta característica es típica de promotores que promueven una expresión ubicua de los genes (162).

2.4.5.1 Rangos de referencia según la significación clínica de alelos con diferente longitud de su secuencia repetitiva de CAG

Para la SCA2 se ha definido como umbral patológico a los alelos con 32 repeticiones de CAG (12). Tanto los alelos normales como los expandidos son polimórficos para el número de repeticiones de CAG en diferentes poblaciones humanas, variando entre 13-31 unidades de CAG los primeros, y entre 32-79 unidades de CAG los mutados o expandidos, aunque han sido reportados casos extremos con 200 a 500 unidades de CAG (163-165).

Los alelos normales tienden a transmitirse de manera estable de generación en generación, si bien la probabilidad de sufrir una expansión durante la transmisión intergeneracional aumenta para los llamados “alelos normales largos” con más de 24 repeticiones de CAG (166). Generalmente, los alelos normales tienen de 1 a 3 interrupciones de CAA en diferentes configuraciones, de las cuales la más frecuente tiene la secuencia: (CAG)₈ CAA (CAG)₄ CAA (CAG)₈ (39). La pérdida de estas interrupciones se ha asociado a una mayor inestabilidad intergeneracional en los alelos normales largos (166); no obstante, aún no se ha definido un rango de alelos intermedios para la SCA2.

Los alelos con 32 a 35 repeticiones de CAG parecen tener baja penetrancia (12, 13, 17, 129, 167); sin embargo, no se ha realizado estudio sistemático alguno que así lo demuestre.

2.4.5.2 Inestabilidad intergeneracional de alelos expandidos y anticipación genética

Los alelos *sca2* expandidos usualmente no tienen interrupciones de CAA (39, 168). Sin embargo, se han identificado alelos mutados en el rango de 32-35 repeticiones con interrupciones de CAA asociados a la enfermedad de Parkinson (*PD*, por sus siglas en inglés), y

a la variante parkinsoniana de la atrofia multisistémica (*MSA-P*, por sus siglas en inglés), lo que demuestra que mutaciones en el gen *sca2* representan causas genéticas de la PD y la MSA-P (132, 169).

Los alelos *sca2* expandidos muestran una inestabilidad intergeneracional de ~80%, con la ocurrencia de expansiones mayores de 10 CAG en el 25% de los casos (38); también se ha reportado la ocurrencia de una inestabilidad somática (170). La inestabilidad intergeneracional se encuentra asociada a una prominente anticipación genética que puede variar entre los dos y 29 años (5, 12). Existe una mayor inestabilidad intergeneracional en transmisiones paternas en comparación con transmisiones maternas, y se han identificado el patrón de interrupciones de CAA y el contenido de GC en secuencias flanqueantes como factores que influyen sobre la inestabilidad de la secuencia repetitiva de CAG (171, 172).

En familias indias con SCA2 se ha encontrado asociación entre la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG y el orden de nacimiento de los descendientes, indicando un importante rol para la edad parental en la inestabilidad (18). Estos fenómenos no han sido suficientemente caracterizados en la población cubana con SCA2.

2.4.5.3 La ataxina-2. Patrón de expresión y función fisiológica

La ataxina-2 es una proteína de 1 312 aminoácidos, con un dominio ácido dentro del que se encuentran dos motivos vinculados al empalme de ARN (Sm1 y Sm2), un sitio hipotético de reconocimiento por la caspasa-3, una señal de distribución mediada por clatrina, y una señal de exportación al Retículo Endoplasmático (173). Además de la forma completa, se han caracterizado tres isoformas de la ataxina-2 humana (173). Es una proteína citoplasmática que puede asociarse al complejo de Golgi y al retículo endoplasmático rugoso (174, 175).

La ataxina-2 humana muestra una expresión ubicua (39), aunque es expresada por menos del 60% de las neuronas de Purkinje del cerebelo, con una distribución dispersa y desigual (176). Los mayores niveles de ataxina-2 se han detectado en el epéndimo y plexo coroideo, seguido por las células de Purkinje cerebelosas, neuronas grandes de la sustancia *nigra* y el núcleo troclear,

neuronas del hipocampo, pirámides corticales, núcleo de la oliva, globo pálido y amígdala. El nivel de ataxina-2 en las células de Purkinje aumenta con la edad, y es mayor en enfermos con SCA2 en comparación con individuos normales (177). También en el ratón y en la *Drosophila melanogaster* el gen es expresado en la mayoría de los tejidos durante la embriogénesis temprana; se ha comprobado que promueve la proliferación de células germinales y la producción de ovocitos en el *Caenorhabditis elegans* (178), y que su ausencia provoca letalidad embrionaria (179).

Varias evidencias sugieren que la ataxina-2 participa en rutas celulares ligadas al procesamiento de ARN y a la regulación traduccional (180-184). Por otra parte, la ataxina-2 de la *D. melanogaster* es un regulador de la formación de filamentos de actina, lo que ha sugerido que la desregulación del citoesqueleto de actina resultante de la actividad alterada de la ataxina-2, pueda ser la causante de la neurodegeneración en la SCA2 (185). También se ha demostrado que la parkina rescata las células de la citotoxicidad inducida por la ataxina-2, regulando los niveles de expresión estacionarios intracelulares de ataxina-2 nativa y mutante (186). Además, se ha sugerido que la ataxina-2 está involucrada en procesos de endocitosis y de señalización intracelular (11, 187).

2.4.6 Correlaciones genotipo-fenotipo

El número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos es el factor genético con mayor influencia sobre el fenotipo clínico de la enfermedad. Existe una clara correlación entre la edad de inicio de la enfermedad y el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, que explica entre el 47 y 80% de la variabilidad de la edad de inicio (21, 188, 189). Sin embargo, la edad de inicio varía ampliamente incluso entre individuos con igual número de repeticiones de CAG. La edad de inicio varía más ampliamente en individuos con menos de 40 repeticiones de CAG, mientras que los alelos con más de 45 unidades de CAG se han asociado con el debut de la enfermedad antes de los 20 años de edad (17, 39, 190).

Este factor genético también influye sobre la presencia de distonía y mioquimia, sobre la disminución de la velocidad sacádica ocular (17, 147), y sobre la puntuación total de ataxia (191, 192). No se ha encontrado asociación entre el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos y el estatus cognitivo (135, 136, 193).

Además del número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, se ha propuesto la existencia de otros factores genéticos o ambientales que pudieran actuar como modificadores del fenotipo clínico. Entre los factores genéticos candidatos a modificadores del fenotipo se encuentran el número de repeticiones de CAG en los alelos normales, la dosis genética, polimorfismos de un solo nucleótido intragénicos, la existencia de un patrón de metilación diferencial, y otros genes no alélicos (20, 21, 194).

El rol de los alelos *sca2* normales sobre la edad de inicio no ha sido estudiado en la población cubana de individuos con SCA2. En otras poblaciones no se ha podido demostrar algún efecto significativo, probablemente debido al uso de muestras muy pequeñas o heterogéneas desde el punto de vista étnico, o a la escasa variabilidad de estos alelos en las muestras estudiadas (17, 195, 196).

A pesar de que inicialmente se sugirió que la homocigosidad para alelos *sca2* expandidos no influye sobre la edad de inicio (40), recientemente fue demostrado que la dosis genética influye sobre la edad de inicio y progresión de la SCA2 (197-199). Los reportes existentes acerca del efecto de la homocigosidad sobre el fenotipo clínico en otras enfermedades poliglutamínicas son contradictorios, si bien la mayoría de las evidencias disponibles apoyan la concepción de un efecto de dosis operando en este grupo de enfermedades (200).

2.4.6.1 Genes modificadores de la edad de inicio

Los genes modificadores pueden ser definidos como una categoría específica de interacción génica, en la que dichos genes aceleran o debilitan la expresión fenotípica de otros genes, a través de formas transitorias de interacción. Pueden o no tener una manifestación propia, pero varían indefectiblemente el efecto de otros genes no alélicos (201).

A pesar de que existen estudios orientados a la identificación de genes modificadores de la edad de inicio en enfermedades poliglutamínicas, pocas investigaciones se han realizado con este propósito en la SCA2. La identificación de genes modificadores a partir del estudio de poblaciones humanas se ha realizado siguiendo la estrategia de pesquisa global del genoma o la de genes candidatos (202). Esta última estrategia parte del conocimiento de la biología molecular de la enfermedad, y de aquellos eventos involucrados de modo específico en los procesos patológicos subyacentes (202).

Varios genes se han identificado como modificadores de la edad de inicio en enfermedades poliglutamínicas (203). Sin embargo, pocos de estos resultados se han replicado en diferentes poblaciones, probablemente debido a diferencias inter-poblacionales en las frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados (204).

La capacidad de las secuencias poliglutamínicas para interactuar entre sí, convierte a las proteínas poliglutamínicas en excelentes candidatos para ser reclutadas en agregados proteicos nucleares, peri-nucleares o citoplasmáticos. Se ha demostrado que la ataxina-3 puede interactuar con la ataxina-1 y con la ataxina-17 en agregados nucleares (205), y que una proteína poliglutamínica expandida puede reclutar a su contraparte normal en agregados nucleares (206, 207). También se ha comprobado la presencia de ataxina-3 y de ataxina-17 nativas en agregados formados por la ataxina-2 expandida (208). Estas observaciones convierten a los genes con secuencias repetitivas de CAG polimórficas en fuertes candidatos a modificadores del fenotipo clínico en la SCA2.

Sobre la base de estas concepciones, se ha identificado al gen *sca2* como modificador de la severidad de las fasciculaciones en individuos con SCA3 (209), y a los genes *rail* y *sca6* como modificadores de la edad de inicio de la SCA2 (19, 21, 22). El gen *rail* codifica para una proteína que actúa como regulador transcripcional (210), mientras que el gen *sca6* codifica para la subunidad 1 α de un canal de calcio (211). No se ha explorado la influencia potencial de estos polimorfismos sobre otros marcadores del fenotipo clínico.

La disfunción de las mitocondrias es importante en la patogénesis de la SCA2 y de otras enfermedades neurodegenerativas (212, 213), por lo que variantes polimórficas del ADN mitocondrial podrían influir sobre el fenotipo clínico en estas enfermedades. En particular, la variante 10398G del complejo I mitocondrial se ha asociado a una disminución del riesgo de padecer de enfermedad de Parkinson (214). Dicha asociación también fue observada en casos españoles (215), pero no fue replicada en una población italiana (216), ni en otra de los EE.UU después de controlar el origen étnico de los casos estudiados (217).

2.4.7 Mecanismos patofisiológicos asociados a la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Se han observado inclusiones intranucleares en tejido encefálico de enfermos con SCA2, pero solo en un 1-2% de las neuronas de regiones cerebrales dañadas exceptuando el cerebelo, lo que sugiere discrepancia entre la formación de inclusiones nucleares y la degeneración en la SCA2 (218). No obstante, se han encontrado microagregados citoplasmáticos de ataxina-2 ampliamente distribuidos en neuronas del sistema nervioso central (63, 208, 219). También se ha sugerido que la ataxina-2 está relacionada con la sensibilidad a estímulos apoptóticos, y que esta función podría perderse con la expansión patológica de su dominio poliglutamínico (185, 220-222). Existen evidencias de la ocurrencia de estrés oxidativo en pacientes con SCA2 (212), y de disminución de los niveles séricos de cinc, hierro y cobre (223). Además, hay una elevada prevalencia de anticuerpos antigliadina asociada a la SCA2, si bien parece no tener gran significación clínica (224).

2.4.8 Alternativas terapéuticas para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

El diagnóstico molecular, presintomático y prenatal de la SCA2, es técnicamente sencillo. Ha sido ampliamente utilizado para el asesoramiento de individuos enfermos o en riesgo interesados en conocer su estatus genético, y es seguro desde el punto de vista del impacto psicológico que produce en el individuo diagnosticado (225).

La terapéutica de la SCA2 es esencialmente sintomática. La presencia de rigidez/bradiquinesia puede ser aliviada con levodopa y la estimulación encefálica profunda es útil para el tratamiento

del temblor postural (226). Las contracturas musculares son eficazmente tratadas con magnesio (11).

La identificación de bajos niveles séricos de cinc y de estrés oxidativo en pacientes cubanos con SCA2, ha conducido al desarrollo de ensayos clínicos aun en curso, con el empleo de sulfato de cinc y Vimang®, con el propósito de evaluar sus potencialidades terapéuticas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño metodológico

Se realizó un estudio transversal correlacional. Este tipo de diseño permite establecer relaciones estadísticas entre dos o más variables o características de los fenómenos en estudio en un momento determinado y tiene un valor explicativo parcial.

3.2 Población fuente

Desde 1990, en el Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias (CIRAH), en Holguín, se ha archivado información clínica, genealógica y molecular correspondiente a 11525 individuos, de los cuales el 49.7% son hombres y el 50.3% son mujeres, pertenecientes a 109 familias holguineras con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. La mayoría de las familias son numerosas: 15 (13.8%) comprenden entre 200 y 650 individuos, y otras 14 (12.8%) familias comprenden entre 100 y 199 personas.

De los individuos registrados, 1 683 han manifestado la enfermedad, han fallecido 1 356 -996 producto a la enfermedad-, y ~7 000 son asintomáticos en riesgo de enfermar (parientes en primer o segundo grado de individuos enfermos). Se han colectado muestras de ADN pertenecientes a 2 305 individuos, incluyendo a 616 individuos enfermos, 1 623 descendientes en riesgo, y 66 esposos (as) no relacionados. Estas muestras de ADN fueron colectadas activamente como parte del Programa Nacional para el Diagnóstico Predictivo de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 en el CIRAH y en el curso del pesquisaje nacional de descendientes en riesgo para la SCA2 llevado a cabo entre los años 2002 y 2004.

3.3 Variación del número de repeticiones de CAG y umbral patológico del gen *sca2*

3.3.1 Sujetos estudiados

Se seleccionó una muestra integrada por 1745 individuos enfermos o con elevado riesgo para la SCA2 pertenecientes a 109 familias cubanas con esta enfermedad. De estos, 534 son

individuos enfermos (30.60% del total) -99 fallecidos debido a la SCA2-, y 1211 (69.40% del total) son descendientes directos de los enfermos. En el grupo de individuos enfermos, la edad varió entre seis y 80 años, y hubo 285 hombres (53.37%). Entre los descendientes directos de los enfermos, la edad varió entre tres y 80 años, y hubo 515 hombres (45.53%).

3.3.2 Técnicas y procedimientos empleados

3.3.2.1 Estudio genealógico

Fueron construidos o actualizados los árboles genealógicos correspondientes a cada una de las familias identificadas a partir del diagnóstico clínico o molecular de SCA2 en los casos índice. Fue obtenida información relativa a las relaciones de parentesco y estatus clínico a través de una entrevista realizada a los casos índice y familiares cercanos. Los árboles genealógicos resultantes fueron digitalizados con el uso del software Cyrillic 3.0 (Cyrillic Software, Reino Unido).

3.3.2.2 Diagnóstico clínico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Cada individuo fue interrogado en busca de síntomas de compromiso del Sistema Nervioso Central o periférico, y posteriormente se le realizó un examen neurológico completo según la metodología establecida por la Clínica Mayo (227). El diagnóstico clínico de SCA2 se basó en la presencia de ataxia cerebelosa, disartria, dismetría, disdiadococinesia, disfagia y enlentecimiento de los movimientos oculares sacádicos.

3.3.2.3 Obtención y conservación de muestras de sangre

Se obtuvieron 20 mL de sangre venosa periférica de cada individuo siguiendo procedimientos estandarizados y las normas de bioseguridad establecidas. La sangre se depositó en tubos cónicos de 50 mL, junto con 200 µL de ácido etilendiamino tetra-acético como anticoagulante. Las muestras se conservaron en frío a 8 °C hasta el momento de la extracción de ADN.

3.3.2.4 Extracción de ADN genómico

Se obtuvo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica, a través de procedimientos estandarizados (228). El último paso de centrifugación produjo dos fases separadas por un interfase; la fase superior correspondió al ADN genómico. Este ADN fue entonces precipitado con etanol absoluto glacial, y luego lavado tres veces con etanol al 70%. El etanol fue eliminado y el ADN fue secado en una estufa durante una hora a 55°C. Una vez seco, el ADN fue disuelto con una solución de tris-EDTA (buffer TE).

3.3.2.5 Determinación de la concentración y pureza del ADN

La cuantificación de la concentración y pureza del ADN fue realizada mediante espectrofotometría, en un espectrofotómetro BioMate (ThermoSpectronic, EE.UU). Para determinar la concentración se obtuvo la absorbancia de la muestra a 260nm, y para determinar la pureza se utilizó la proporción de las absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm (260 nm/280 nm). Se consideró como ADN con un buen nivel de pureza, cuando dicho valor estuvo entre 1.5 y 2.0 según lo previamente reportado (228).

3.3.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *polymerase chain reaction*)

Se realizaron PCRs para amplificar los fragmentos de ADN contentivos de la secuencia repetitiva de CAG en el gen *sca2*, siguiendo un protocolo estandarizado (38). Se utilizó el kit “PureTaq Ready-to-go” (Amersham Biosciences, Suecia) o, alternativamente, una mezcla de reacción contentiva de 150 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.5 µM de cada cebador, 1U de Ampli Taq ADN polimerasa (Roche, EE.UU), 100-200 ng de ADN genómico, y agua miliQ para un volumen final de 20 µL. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, EE.UU).

3.3.2.7 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis de ADN en geles de agarosa permitió evaluar la calidad de la PCR, así como realizar una evaluación semi-cuantitativa de la longitud de la secuencia repetitiva de CAG en el gen *sca2*. Se tomó una alícuota (8 µL) de cada producto de la PCR y se mezcló con 2 µL 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 μL 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 (EDAS290) (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.

3.3.2.8 Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida. Análisis automático de fragmentos de ADN y estimación del número de repeticiones de CAG en el gen *sca2*

La electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida permitió determinar la longitud de la secuencia repetitiva de CAG en el gen *sca2*. Se tomó una alícuota (4 μL) de cada producto de la PCR y se mezcló con 1 μL de un marcador de peso molecular interno de 100pb, 1 μL de un marcador de peso molecular interno de 300pb, y 3 μL de una solución de bromo-fenol azul. Paralelamente, se prepararon dos mezclas contentivas de 4 μL de agua destilada, 2 μL de un marcador de peso molecular externo consistente en una colección de fragmentos de ADN de 50 a 500pb con incrementos de 50pb, y 3 μL de una solución de bromo-fenol azul. Estas mezclas se depositaron en pocillos independientes de un gel de poliacrilamida al 12% en un secuenciador automático de genes ALFexpress II (Amersham Biosciences, Suecia), con una solución de tris-borato-EDTA (TBE) al 0.5x como buffer de corrida. Se aplicó una corriente de 660V, 36mA y 25W de potencia durante 200 minutos; la temperatura se mantuvo constante a 55°C. La corrida electroforética fue controlada y supervisada en tiempo real a través del software ALF DNA Sequence Analyzer (Amersham Biosciences, Suecia), mientras

que el tamaño de cada fragmento de ADN fue determinado con el uso del software *Allele Links* (versión 1.0) (Amersham Biosciences, Suecia). En el caso particular de los alelos expandidos, como la inestabilidad somática característica del locus *sca2* da lugar a subpoblaciones leucocitarias con alelos que difieren en su número de repeticiones de CAG, se tomó el alelo correspondiente a la señal de mayor intensidad como el más representativo y característico de cada individuo en particular. La conversión de pares de bases a número de repeticiones de CAG se realizó de acuerdo a lo previamente publicado por Imbert *et al.* (38).

3.3.2.9 Secuenciación del fragmento repetitivo de CAG del gen *sca2*

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termocilador 9600 (Perkin Elmer, EE.UU), con el uso de un kit de secuenciación de la misma firma. Como cebador se utilizó el oligonucleótido DAN1 (38). Los productos de la PCR se corrieron en geles de poliacrilamida al 6% en un secuenciador automático ABI 373A (Perkin Elmer, EE.UU). Los datos fueron procesados con el uso del software de colección y análisis de datos del ABI 373A.

3.3.3 Variables analizadas

- Frecuencias génicas para el locus *sca2*: Se definió como el número de veces en que un alelo *sca2* particular se encontró presente, en relación con el número total de alelos para el locus *sca2* existentes en la población en estudio.
- Frecuencias genotípicas para el locus *sca2*: 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 *sca2*, en relación con el total de genotipos para este locus en la población en estudio.
- Heterocigocidad observada (H_o): Se definió como la frecuencia media de individuos heterocigotos para el locus *sca2* observada en la muestra estudiada.
- Heterocigocidad esperada (H_e): Se definió como la frecuencia media esperada de individuos heterocigotos para el locus *sca2* en la muestra estudiada bajo condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg.

- Exceso de heterocigocidad: Se definió como el cociente de la diferencia de la heterocigosidad observada menos la esperada, entre la heterocigosidad esperada. O sea,

$$= (H_o - H_e) / H_e \quad (229).$$

3.4 Penetrancia de alelos *sca2* expandidos

3.4.1 Sujetos estudiados

A partir del grupo de individuos descrito en el epígrafe 3.3.1, se seleccionó una muestra integrada por 924 individuos con alelos *sca2* cuyas secuencias repetitivas de CAG variaron entre 32 y 79 unidades. De estos, 530 son enfermos y genotípicamente heterocigóticos (57.4% del total) (284 hombres, 53.6%), y 394 sujetos (42.6%) estaban clínicamente sanos al momento del estudio (presintomáticos) (174 hombres, 44.2%).

3.4.2 Técnicas y procedimientos empleados

Las técnicas y procedimientos empleados para el estudio de la penetrancia de los alelos *sca2* expandidos fueron los mismos descritos en los epígrafes 3.3.2.1 al 3.3.2.8.

3.4.3 Variables analizadas

- Alelos *sca2* expandidos: Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen *sca2* con más de 31 repeticiones de CAG, se identificaron por el número de repeticiones de CAG que les fuera característico.
- Penetrancia de alelos *sca2* expandidos: Proporción de individuos portadores de al menos un alelo *sca2* expandido, que manifiestan la SCA2 antes de los 75 años de edad en el caso de los hombres y de los 79.3 años en el caso de las mujeres, con relación al total de individuos portadores de al menos un alelo *sca2* expandido; se expresó en porcentaje.

3.5 Inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* normales largos

3.5.1 Sujetos estudiados

A partir del grupo de individuos descrito en el epígrafe 3.3.1, se compuso una muestra integrada por 17 pares progenitor-descendiente (nueve transmisiones paternas, 52.9%) y 57

pares de hermanos (34 transmisiones paternas, 59.6%) portadores de alelos *sca2* con 25 a 31 repeticiones de CAG, pertenecientes a 17 familias con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

3.5.2 Técnicas y procedimientos empleados

Las técnicas y procedimientos empleados para el estudio de la inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* normales largos fueron los mismos descritos en los epígrafes 3.3.2.1 al 3.3.2.8.

3.5.3 Variables analizadas

- Inestabilidad intergeneracional: Cambio en el número de repeticiones de CAG del gen *sca2* durante su transmisión de progenitores a descendientes. Se determinó su frecuencia (número de ocasiones en que se observa inestabilidad intergeneracional con respecto al total de transmisiones estudiadas; fue expresada en porcentaje), magnitud (número de unidades de CAG añadidas o sustraídas al alelo del progenitor durante su transmisión intergeneracional; se calculó sustrayendo el número de repeticiones de CAG en el gen *sca2* del progenitor al de su descendiente), y direccionalidad (ocurrencia de “expansiones” -incremento en el número de unidades de CAG- o de “contracciones” -disminución en las unidades de CAG-).
- Alelos *sca2* normales largos: Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen *sca2* con 25 a 31 repeticiones de CAG, según Mizushima *et al.* (230).
- Vía de transmisión del “alelo *sca2* normal largo”: Expresó de cuál de sus progenitores el individuo heredó un alelo con 25 a 31 repeticiones de CAG. Se clasificó en paterna y materna.

3.6 Inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos

3.6.1 Sujetos estudiados

A partir del grupo de individuos descrito en el epígrafe 3.3.1, se seleccionó una muestra integrada por 225 pares progenitor-descendiente pertenecientes a 57 familias con SCA2, y cuyos alelos *sca2* expandidos variaron entre 32 y 79 repeticiones de CAG. El 47.6% (107/225) de las transmisiones analizadas fueron paternas.

Para la estimación de la heredabilidad de la varianza residual de la inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos se conformaron 84 pares de hermanos pertenecientes a 50 familias con SCA2 (48 con transmisión paterna, 57.1%).

3.6.2 Técnicas y procedimientos empleados

Las técnicas y procedimientos empleados para el estudio de la inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos fueron los mismos descritos en los epígrafes 3.3.2.1 al 3.3.2.8.

3.6.3 Variables analizadas

- Inestabilidad intergeneracional: Fue definida según se expresa en el epígrafe 3.5.3.
- Alelos *sca2* expandidos: Fueron definidos según se expresa en el epígrafe 3.4.3.
- Vía de transmisión de alelos *sca2* expandidos: Expresó de cuál de sus progenitores el individuo heredó la mutación causante de la enfermedad. Se clasificó en paterna y materna.
- Edad conceptiva: Se definió como la edad del progenitor en el momento de la concepción. Se expresó en años.
- Sexo: Se definió como la condición orgánica que distingue lo masculino de lo femenino según el examen físico, la entrevista a los familiares o la revisión de la historia clínica en los casos fallecidos. Se clasificó en masculino y femenino.

3.7 Edad de inicio y riesgo bayesiano dependiente de la edad

3.7.1 Sujetos estudiados

Para la descripción de la variabilidad de la edad de inicio y para el cálculo del riesgo bayesiano para individuos asintomáticos con un riesgo *a priori* de enfermar clínicamente del 50% o del 25%, se seleccionó una muestra integrada por 748 enfermos de SCA2. En este grupo hubo 382 hombres, para un 51.1% del total.

3.7.2 Técnicas y procedimientos empleados

Las técnicas y procedimientos empleados para el estudio de la edad de inicio y del riesgo bayesiano dependiente de la edad fueron los mismos descritos en los epígrafes 3.3.2.1 y 3.3.2.2.

3.7.3 Variables analizadas

- Edad de inicio de la enfermedad: Se definió como el momento a partir del cual el individuo comenzó a manifestar síntomas característicos de la SCA2, que representaron un cambio permanente en su estado de salud. Se obtuvo a través de un interrogatorio al individuo enfermo o familiares, o a través de la revisión de las historias clínicas correspondientes. Se expresó en años.

3.8 Influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre el fenotipo clínico de la enfermedad

3.8.1 Sujetos estudiados

Para el estudio de la influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre la edad de inicio de la enfermedad, y para obtener estimados probabilísticos de la edad de inicio de la enfermedad, se utilizó la muestra integrada por 530 enfermos y 394 presintomáticos previamente descrita en el epígrafe 3.4.1.

Para el estudio de la influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre marcadores adicionales del fenotipo clínico se conformaron muestras de acuerdo al número de individuos enfermos disponibles. La duración de la vida y la duración de la enfermedad fueron determinadas en 99 enfermos (46 hombres, 46.5%), para 66 de los cuales fue establecido el genotipo para el locus *sca2*. La puntuación total de ataxia fue determinada en 135 enfermos (73 hombres, 52.9%), cuyas edades variaron entre los 13 y 80 años. La velocidad sacádica máxima y la latencia sacádica fueron determinadas en 94 enfermos (58 hombres, 61.7%), cuyas edades variaron entre los 13 y 80 años. La tasa de progresión de la enfermedad fue determinada en el mismo grupo de enfermos en que fuera determinada la puntuación total de ataxia.

3.8.2 Técnicas y procedimientos empleados

3.8.2.1 Evaluación clínica de individuos enfermos con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

El procedimiento empleado para la evaluación clínica de los individuos enfermos fue comentado en el epígrafe 3.3.2.2. Para cuantificar la severidad de las alteraciones neurológicas, se aplicó la Escala Cooperativa Internacional para la Evaluación de la Ataxia (ICARS, por sus siglas en inglés) (140).

3.8.2.2 Estudio electrofisiológico de la velocidad sacádica

3.8.2.2.1 Registro electronistagmográfico

El registro se realizó con electrodos de plata clorurados (electrodo activo en el canto externo derecho, referencia en el canto externo izquierdo) en un electronistagmógrafo de dos canales (Jaeger-Toennies, D-97204 Höchberg, Alemania) con un filtraje de 0.02-70 Hz, sensibilidad de 200 μ V/división, tiempo de análisis de 1000 ms/división, y una frecuencia de muestreo de 200 Hz. Para generar el estímulo se utilizó un monitor en el que se mostró un círculo de color blanco subtendido a un ángulo de 0.7 grados sobre un fondo negro. La distancia entre el individuo y el monitor, así como la posición de la cabeza, se controlaron a través de un soporte colocado en la barbilla y la cabeza del individuo estudiado. Se obtuvieron 10 sácadas horizontales derechas e izquierdas. Se registraron sácadas a diferentes amplitudes (10°, 20°, 30° y 60°). Para el control de los artefactos se utilizó una calibración a 30 grados antes y después de cada registro.

3.8.2.2.2 Análisis de las sácadas

Los registros se preservaron en código ASCII y fueron importados a un programa confeccionado con el software MATLAB (versión 6.1) (231), para la identificación manual de las sácadas. La latencia y la velocidad sacádica máxima fueron calculadas para la dirección derecha e izquierda y luego se promediaron para cada amplitud.

3.8.2.3 Técnicas y procedimientos empleados en los estudios moleculares

Para la realización de los estudios de genética molecular fueron empleados las técnicas y procedimientos descritos en los epígrafes 3.3.2.3 al 3.3.2.8.

3.8.3 Variables analizadas

- Sexo: Se definió como la condición orgánica que distingue lo masculino de lo femenino según el examen físico, la entrevista a los familiares o la revisión de la historia clínica en los casos fallecidos. Se clasificó en masculino y femenino.
- Edad: Se definió como el tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo hasta el momento en que se estudia. Se expresó en años.
- Edad de inicio de la enfermedad: Fue definida según se expresa en el epígrafe 3.7.3.
- Duración de la vida: Se definió como el tiempo transcurrido entre el nacimiento del individuo y su fallecimiento a causa de la enfermedad. Se expresó en años.
- Duración de la enfermedad: Se definió como el tiempo transcurrido entre la manifestación clínica de la enfermedad y el fallecimiento del individuo a causa de esta. Se expresó en años.
- Tiempo de evolución de la enfermedad: Se definió como el tiempo transcurrido entre la manifestación de los primeros síntomas clínicos de la enfermedad y el momento en que se estudia al individuo en cuestión. Se expresó en años.
- Puntuación total de ataxia: Se definió como la sumatoria de las puntuaciones parciales de la escala ICARS.
- Velocidad sacádica máxima (VSM): Se definió como la velocidad máxima del movimiento sacádico ante la aplicación de un estímulo visual. Se expresó en grados/segundo.
- Latencia sacádica: Tiempo que transcurrió entre el estímulo visual y la aparición de la respuesta que este produce. Se expresó en milisegundos.
- Tasa de progresión de la enfermedad: Se definió como el cociente entre la puntuación total ataxia y la edad, o el tiempo de evolución de la enfermedad.

- Alelos *sca2* expandidos: Fueron definidos según se expresa en el epígrafe 3.4.3.

3.9. Influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y del genotipo *sca2* sobre el fenotipo clínico de la enfermedad

3.9.1 Sujetos estudiados

Para el estudio de la influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y del genotipo *sca2* sobre el fenotipo clínico de la enfermedad fueron empleadas las muestras descritas en el epígrafe 3.8.1, exceptuando a los 394 individuos presintomáticos.

3.9.2 Técnicas y procedimientos empleados

Se emplearon las mismas técnicas y procedimientos descritos en el epígrafe 3.8.2.

3.9.3 Variables analizadas

Se emplearon las mismas variables definidas en el epígrafe 3.8.3, y adicionalmente:

- Alelos *sca2* normales: Se definieron como cada una de las formas alternativas del gen *sca2* con menos de 32 repeticiones de CAG, se identificaron por el número de repeticiones de CAG que les fuera característico.
- Genotipo *sca2*: Se definió como la constitución genética del individuo con respecto al locus *sca2*, y se expresó de dos maneras alternativas, como el resultado de la sumatoria del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normal y expandido, según Pulst *et al.* (21), o como variable categórica donde cada combinación alélica representa una categoría específica.

3.10 Influencia de la dosis genética sobre el fenotipo clínico de la enfermedad

3.10.1 Sujetos estudiados

Para el estudio de la influencia de la dosis genética sobre el fenotipo clínico de la enfermedad, se seleccionó una muestra integrada por los cuatro enfermos homocigóticos para alelos *sca2* expandidos identificados en la población cubana con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Solo uno de los enfermos homocigóticos para alelos *sca2* expandidos fue de sexo masculino (25.0%), dos estaban vivos al momento del estudio con edades de 64 y 80 años, mientras que

los otros dos casos homocigóticos habían fallecido a edades de 35 y 80 años. También se incluyeron en la muestra 72 enfermos heterocigóticos cuyos alelos *sca2* expandidos tuvieron igual número de repeticiones de CAG que los de los homocigóticos (alelos con 34, 35 o 41 unidades de CAG). El 43.1% (31/72) del total de individuos heterocigóticos fue de sexo masculino.

3.10.2 Técnicas y procedimientos empleados

Se emplearon las mismas técnicas y procedimientos descritos en el epígrafe 3.8.2.

3.10.3 Variables analizadas

Se emplearon las mismas variables definidas en el epígrafe 3.8.3.

3.11 Componentes genético y ambiental de la varianza residual de la edad de inicio

3.11.1 Sujetos estudiados

A partir de la muestra de 530 individuos enfermos y genotípicamente heterocigóticos descrita en el epígrafe 3.4.1, se seleccionó una muestra integrada por 336 individuos pertenecientes a 101 familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, que conformaron 122 grupos de hermanos. A partir de estos grupos de hermanos se compusieron 337 pares de hermanos. El 47.8% (161/337) del total de pares de hermanos estuvo integrado por hermanos del mismo sexo, mientras que en el 40.4% (136/337) de los casos los hermanos heredaron el alelo *sca2* expandido por vía paterna.

3.11.2 Técnicas y procedimientos empleados

Se emplearon las mismas técnicas y procedimientos descritos en el epígrafe 3.8.2.

3.11.3 Variables analizadas

- Edad de inicio residual: Se definió como el valor resultante de ajustar, por regresión lineal múltiple, la edad de inicio al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandido y normal.
- Familiaridad de la edad de inicio residual: Se definió como el estimado que refleja el límite superior de la heredabilidad, y que expresa la componente en la variabilidad de la

edad de inicio residual debida a factores genéticos y ambientales compartidos por grupos familiares (232).

3.12. Genes candidatos a modificadores del fenotipo clínico de la enfermedad

3.12.1 Sujetos estudiados

Para la identificación de genes modificadores del fenotipo clínico se realizó un muestreo intencional que partió de los 530 individuos enfermos previamente descritos en el epígrafe 3.4.1, para seleccionar dos grupos de individuos pertenecientes a los dos extremos de la distribución de los residuales para la edad de inicio una vez ajustada al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos y normales. El primer grupo (con inicio “premature”, $n=29$) consistió en individuos no relacionados que tuvieron una edad de inicio una desviación estándar más temprana que la edad de inicio media. El 58.6% (17/29) de los individuos incluidos en este grupo fue de sexo masculino, con edades que variaron entre 18 y 76 años. El segundo grupo (con inicio “tardío”, $n=21$) estuvo integrado por individuos que tuvieron una edad de inicio una desviación estándar más tardía que la edad de inicio media. El 66.7% (14/21) de los individuos incluidos en este grupo fue de sexo masculino, con edades que variaron entre 30 y 74 años.

3.12.2 Técnicas y procedimientos empleados

Se emplearon las mismas técnicas y procedimientos descritos en el epígrafe 3.8.2. Se utilizaron cebadores y protocolos de PCR estandarizados para amplificar los fragmentos de ADN contentivos de la secuencia repetitiva de CAG correspondientes a los genes *sca1* (37), *sca3* (41), *sca6* (42), *sca17* (44) y *drpla* (36), y para amplificar el fragmento de ADN contentivo del polimorfismo 10398G/A en el gen *MTND3* (217).

Los productos de la PCR para los genes *sca1*, *sca3*, *sca6*, *sca17* y *drpla*, fueron sometidos a electroforesis en agarosa y poliacrilamida como fuera descrito en los epígrafes 3.3.2.7 y 3.3.2.8. Los productos de la PCR para el gen *MTND3* fueron sometidos a digestión enzimática para revelar las variantes presentes del polimorfismo 10398A/G. Para esto se tomó

una alícuota de 15 µL del producto de la amplificación por PCR del fragmento de ADN contentivo del polimorfismo 10398G/A en el gen *MTND3*, y se mezcló con 2.25 µL de buffer, 6U de la enzima de restricción *TaqI*, y 4.65 µL de agua miliQ. La mezcla fue incubada a 37°C durante no menos de dos horas. Al producto de la digestión enzimática se le realizó una electroforesis en geles de agarosa (*ver epígrafe 3.3.4.6*). La presencia de la variante alélica 10398G dio lugar a un fragmento de 82 pares de bases, mientras que la presencia de la variante 10398A dio lugar a fragmentos de 30 y 52 pares de bases.

3.12.3 Variables analizadas

Para cada uno de los cinco genes con secuencias repetitivas de CAG candidatos a modificadores del fenotipo clínico en nuestro estudio (*sca1*, *sca3*, *sca6*, *sca17* y *drpla*), se especificaron:

- Alelos cortos: Se definieron como aquellos con menor número de repeticiones de CAG en individuos heterocigóticos.
- Alelos largos: Se definieron como aquellos con mayor número de repeticiones de CAG en individuos heterocigóticos.
- Genotipo: Se definió como la constitución genética del individuo con respecto a cada uno de los loci particulares, y se expresó como el resultado de la sumatoria del número de repeticiones de CAG en alelos largos y cortos, según Pulst *et al.* (21).
- Para el gen *MTND3* se especificó:
 - Polimorfismo mt10398A/G: Se definió como el cambio de adenina por guanina en la posición 10398 del gen que codifica para la subunidad ND3 de la NADH ubiquinona óxido-reductasa.

Se emplearon además las variables definidas en el epígrafe 3.8.3.

3.13 Procesamiento estadístico de la información

Para la descripción de las variables estudiadas se realizaron análisis de distribuciones de frecuencias, donde se emplearon estadígrafos de asimetría y curtosis para caracterizar la

forma de las distribuciones, así como la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de la distribución de los datos. Se emplearon además estadígrafos descriptivos de tendencia central (media aritmética, mediana, moda, y cuartiles) y de dispersión (rango y desviación estándar).

La estimación del riesgo genético en descendientes de individuos con SCA2, fue realizada a través del teorema de probabilidad condicionada de Bayes. Una fórmula generalizada del análisis bayesiano puede ser representada como: $P = \alpha\beta_i / [\alpha\beta_i + (1-\alpha)\gamma]$ (233). La probabilidad *a priori* de ser portador de la mutación SCA2 es designada como α , y la probabilidad *a priori* de no ser portador de la mutación SCA2 es designada como $(1-\alpha)$. La probabilidad de no haber enfermado a una edad determinada asumiendo que el descendiente en riesgo es portador de la mutación SCA2 es designada como β_i (β_i fue calculada a través de la frecuencia relativa acumulativa para la edad de inicio). La probabilidad de no haber enfermado a una edad determinada asumiendo que el descendiente en riesgo no es portador de la mutación SCA2 es designada como γ ($\gamma=1$).

Se empleó la prueba de ji-cuadrado (χ^2) para comprobar la existencia o no de asociación estadísticamente significativa entre las variables:

- Frecuencia de la inestabilidad intergeneracional y vía de transmisión de alelos *sca2* normales largos.
- Direccionalidad de la inestabilidad intergeneracional y vía de transmisión de alelos *sca2* normales largos.
- Direccionalidad de la inestabilidad intergeneracional y vía de transmisión de alelos *sca2* expandidos.
- Direccionalidad de la inestabilidad intergeneracional y sexo de los descendientes.

Se empleó la prueba exacta de Fisher para comprobar la existencia o no de asociación estadísticamente significativa entre las variables:

- Edad de inicio (operacionalizada en forma de los grupos “prematureo” y “tardío”) y la presencia/ausencia del polimorfismo mt10398G.

Se empleó la prueba t de Student para comprobar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las variables en las siguientes situaciones (en todos los casos se verificó el cumplimiento del presupuesto relativo a la homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene):

- Magnitud de expansiones y magnitud de contracciones intergeneracionales de la secuencia repetitiva de CAG de alelos *sca2* expandidos.
- Magnitud de la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG entre individuos con transmisión paterna o materna de alelos *sca2* expandidos.
- Magnitud de las expansiones de la secuencia repetitiva de CAG entre individuos con transmisión paterna o materna de alelos *sca2* expandidos.
- Magnitud de las contracciones de la secuencia repetitiva de CAG entre individuos con transmisión paterna o materna de alelos *sca2* expandidos.
- Magnitud de la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG entre individuos de sexo masculino o femenino.
- Edad de inicio entre individuos enfermos de sexo masculino o femenino.
- Tasa de progresión de la enfermedad entre individuos enfermos de sexo masculino o femenino.
- Edad de inicio entre individuos enfermos con <22 o ≥ 22 repeticiones de CAG en sus alelos *sca2* normales.

Se empleó la prueba U de Mann-Whitney para comprobar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las variables en las siguientes situaciones:

- Edad de inicio entre individuos enfermos pertenecientes a los grupos “prematureo” o “tardío”.
- Número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales entre individuos enfermos pertenecientes a los grupos “prematureo” o “tardío”.

- Número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos entre individuos enfermos pertenecientes a los grupos “prematur o” o “tardío”.
- Genotipo *sca2* entre individuos enfermos pertenecientes a los grupos “prematur o” o “tardío”.
- Número de repeticiones de CAG en los alelos cortos para los genes *sca1*, *sca3*, *sca6*, *sca17* y *drpla* entre individuos enfermos pertenecientes a los grupos “prematur o” o “tardío”.
- Número de repeticiones de CAG en los alelos largos para los genes *sca1*, *sca3*, *sca6*, *sca17* y *drpla* entre individuos enfermos pertenecientes a los grupos “prematur o” o “tardío”.
- Genotipo para los genes *sca1*, *sca3*, *sca6*, *sca17* y *drpla* entre individuos enfermos pertenecientes a los grupos “prematur o” o “tardío”.

Se empleó el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson para comprobar la existencia o no de asociación estadísticamente significativa entre las variables:

- Magnitud de la inestabilidad intergeneracional y número de repeticiones de CAG de los alelos *sca2* expandidos transmitidos.
- Magnitud de la inestabilidad intergeneracional y edad conceptiva del progenitor.
- Número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos de los descendientes y edad conceptiva del progenitor.
- Número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos y media y cuartiles para la edad de inicio de la enfermedad.
- Número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos y número de repeticiones de CAG en los genes *sca1*, *sca3*, *sca6*, *sca17* y *drpla*.

Se usó el análisis de varianza factorial de dos vías para evaluar el efecto de la vía de transmisión de la mutación, y de su interacción con el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, con la edad conceptiva y con sexo del descendiente, sobre la inestabilidad intergeneracional de los alelos *sca2* expandidos. Se definieron los terciles

correspondientes a cada variable cuantitativa: edad conceptiva (años), T1 (14-23), T2 (24-29) y T3 (30-51); alelos *sca2* expandidos (número de repeticiones de CAG), T1 (32-37), T2 (38-40) y T3 (41-49).

Se utilizó el análisis de regresión simple y múltiple para evaluar la influencia de factores genéticos y fisiológicos sobre marcadores del fenotipo clínico y para generar modelos predictivos. En el caso particular de la edad de inicio, para ajustar la data a un modelo exponencial simple utilizamos la ecuación: $\log EI = \alpha + \beta(\text{alSCA2}_{\text{exp}})$, donde “logEI” es el logaritmo natural de la edad de inicio de la enfermedad, y “alSCA2_{exp}” es el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos. Para ajustar la data a un modelo bi-segmentado usando cada “alSCA2_{exp}” como punto de inflexión (I), codificamos dos nuevas variables para cada individuo, donde $X_1 = \text{alSCA2}_{\text{exp}} - I$ para $\text{alSCA2}_{\text{exp}} \leq I$, y $X_1 = 0$ para $\text{alSCA2}_{\text{exp}} > I$; $X_2 = 0$ para $\text{alSCA2}_{\text{exp}} \leq I$, y $X_2 = \text{alSCA2}_{\text{exp}} - I$ para $\text{alSCA2}_{\text{exp}} > I$. El modelo bi-segmentado resultante es: $\log EI = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$. Para cada modelo de regresión fueron calculados los valores del coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}). Dado que los modelos son anidados, evaluamos la significación de la naturaleza fraccionaria de la línea bi-segmentada estimando la probabilidad de identidad entre las dos pendientes como hipótesis nula. A la vez, estimamos el punto de inflexión que implica el máximo incremento en el valor R^2_{aj} .

Para calcular la probabilidad de llegar a manifestar la SCA2 a una edad específica teniendo un número de repeticiones de CAG dado, se empleó el método de Kaplan-Meier para análisis de supervivencia. Fueron incluidos enfermos y presintomáticos según su edad y su número de repeticiones de CAG; los individuos con más de 31 repeticiones de CAG fueron considerados como una cohorte en riesgo, desde el nacimiento hasta la aparición de signos neurológicos o hasta la muerte o hasta el último contacto (censurados). Las curvas de Kaplan-Meier fueron comparadas entre sí a través de la prueba estadística Log-Rank.

Para estimar la heredabilidad de la varianza residual de la inestabilidad intergeneracional y de la edad de inicio de la enfermedad, realizamos un ANOVA de una vía para determinar los componentes de varianza correspondientes entre los pares de hermanos y en los pares de hermanos, que luego fueron utilizados para calcular los coeficientes de correlación intraclase (234). El duplo del valor de estos coeficientes representa la familiaridad, que es el límite superior de la heredabilidad (232).

Para controlar el error de tipo I en casos donde se evaluaron hipótesis múltiples se utilizó la corrección secuencial de Bonferroni a través del método de Holm (235).

La heterocigocidad observada, la esperada y el exceso de heterocigocidad fueron calculados con el software Genetic Data Analysis (GDA) (236). Los análisis estadísticos fueron realizados con el software STATISTICA (versión 6.0) (237).

3.14 Aspectos éticos de la investigación

El protocolo de investigación fue aprobado por el Consejo Científico y la Comisión de Ética de la institución. Fue llevado a cabo en correspondencia con las regulaciones establecidas en las declaraciones de Helsinski, Edimburgo y Escocia de octubre del 2000. Los pacientes confirmaron voluntariamente y por escrito su disposición de participar en el mismo mediante un modelo de consentimiento informado.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Variación del número de repeticiones de CAG del gen *sca2* en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Rangos de referencia

4.1.1 Umbral patológico y frecuencias génicas y genotípicas para el gen *sca2*

A partir del estudio de poblaciones con SCA2 identificadas en varias regiones del mundo, se ha propuesto que el gen *sca2* provoca las manifestaciones clínicas características de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, solo cuando su secuencia repetitiva de CAG sobrepasa las 31 unidades (12). Esta proposición fue re-evaluada en una muestra conformada por 1745 individuos pertenecientes a familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (*ver epígrafe 3.3.1*). En esta muestra, la serie alélica correspondiente al locus *sca2* estuvo conformada por alelos cuyas secuencias repetitivas de CAG variaron entre las 13 y 79 unidades; el alelo salvaje fue el de 22 repeticiones de CAG representando el 58.3% del total.

Se comprobó que no existen personas enfermas con alelos *sca2* de menos de 32 repeticiones de CAG. Hubo 37 individuos con secuencias repetitivas de CAG entre 25 y 31 unidades, cuyas edades estuvieron entre 21 y 75 años; ninguno tuvo manifestaciones clínicas de la enfermedad aun cuando algunos alcanzaron edades avanzadas. De hecho, nueve (24.3%) de estos individuos tenían más de 60 años en el momento del estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución por edades de individuos con 25-31 repeticiones de CAG en el gen *sca2*.

Número de repeticiones de CAG	No. de individuos con edad (años) de					Total
	<60	60-64	65-69	70-74	75-80	
25	1	2	1	0	0	4
27	8	0	1	1	0	10
28	1	1	0	0	0	2
29	5	0	0	1	0	6
30	10	0	0	0	1	11
31	3	0	1	0	0	4
Total	28	3	3	2	1	37

De los cinco individuos portadores de un alelo con 32 repeticiones de CAG incluidos en la muestra, solo uno llegó a manifestar la enfermedad. Se trató de una paciente (Figura 1; III5) que debutó con ataxia de la marcha a los 45 años de edad, y que ha manifestado disimetría ligera, disartria, disfagia ocasional, reflejos osteo-tendinosos ligeramente aumentados y movimientos oculares dentro de la normalidad, en lenta progresión a lo largo de 41 años de evolución. Su genotipo fue de 23/32 unidades de CAG; el análisis de secuencia demostró que ambos alelos se encuentran interrumpidos por un CAA: $(CAG)_{13}CAA(CAG)_9$ y $(CAG)_{29}CAA(CAG)_2$, respectivamente. El alelo con 32 unidades de CAG probablemente surgió a partir de la contracción de un alelo paterno con 34 unidades de CAG (Figura 1; II1).

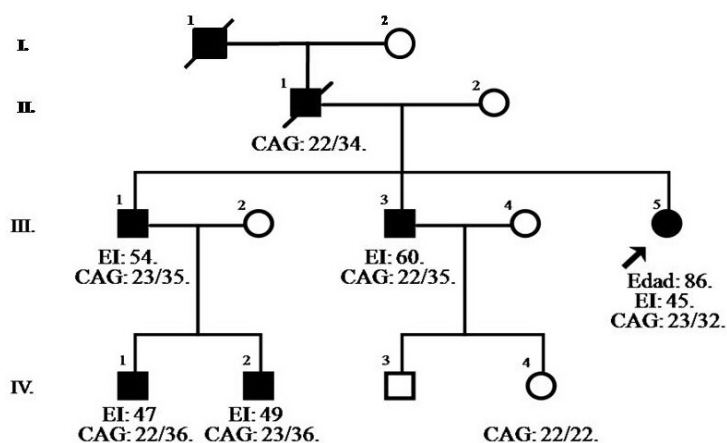


Figura 1. Árbol genealógico correspondiente a la familia del único caso reportado en el mundo que ha enfermado de SCA2 siendo portador de un alelo con 32 repeticiones de CAG. *Abreviaturas:* EI- Edad de inicio de la enfermedad; CAG- genotipo según el número de repeticiones de CAG en alelos normales y expandidos.

La confirmación del umbral patológico para el gen *sca2* permitió describir la distribución de frecuencias correspondientes a los alelos normales y expandidos. La distribución del número de repeticiones de CAG fue bimodal, representando la combinación de dos curvas con transición continua: la correspondiente a los alelos normales (moda: 22 CAGs), y la de los alelos expandidos (moda: 37 CAGs) (Figura 2).

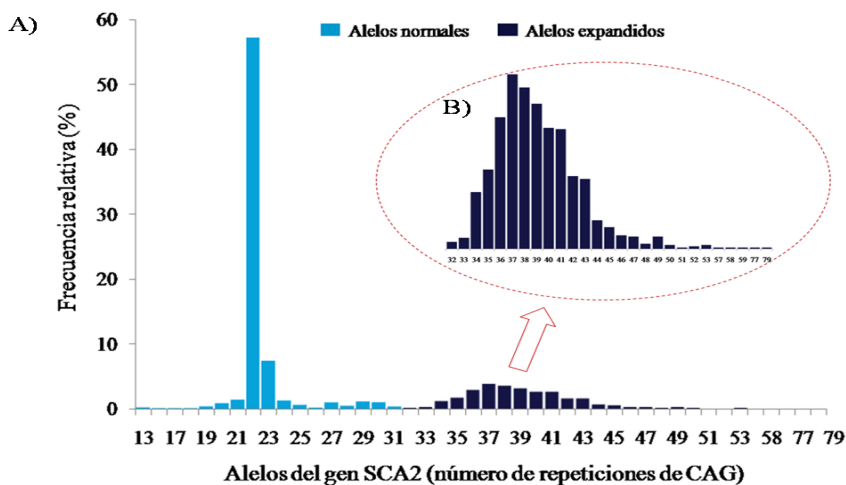


Figura 2. Distribución de frecuencias para los alelos *sca2* en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 ($n=3490$ cromosomas). A) Representación de las frecuencias de alelos *sca2* normales y expandidos. B) Ampliación de la distribución de frecuencias de los alelos *sca2* expandidos -puede apreciarse la forma aproximadamente normal de la distribución-.

Los alelos *sca2* normales variaron entre 13 y 31 unidades de CAG, con una media y desviación estándar de 22.4 ± 1.74 repeticiones; los alelos con 22 CAGs representaron el 78.1% de la distribución de los alelos normales, y aquellos con >24 CAGs representaron el 6.11%. La distribución de frecuencias correspondiente a los alelos normales tuvo una asimetría (D.E) de 2.31 (0.05), y una curtosis (D.E) de 12.12 (0.10), lo que indica un desplazamiento hacia la izquierda y una distribución leptocúrtica. La no normalidad de la distribución fue confirmada a través de la prueba de Shapiro-Wilk ($SW-W=0.48$; $p<0.001$).

Los alelos *sca2* expandidos variaron entre 32 y 79 unidades de CAG, con una media y desviación estándar de 39.2 ± 3.96 ; los alelos con 37 repeticiones de CAG representaron el 13.9% de la distribución, y aquellos con más de 37 repeticiones de CAG representaron el 22.6%. La distribución de frecuencias correspondiente a los alelos expandidos tuvo una asimetría (D.E) de 2.86 (0.08), y una curtosis (D.E) de 20.86 (0.16). La no normalidad de la distribución fue confirmada a través de la prueba de Shapiro-Wilk ($SW-W=0.83$; $p<0.001$).

El genotipo *sca2* más frecuente fue el de 22/22 repeticiones de CAG, que representó el 25.1% (438/1745) de la distribución de frecuencias genotípicas. El genotipo *sca2* más frecuente entre los enfermos fue el 22/37 repeticiones de CAG (14.04% del total de enfermos). La heterocigocidad observada fue de 0.53, y la esperada fue de 0.39; el exceso de heterocigocidad fue del 35.9%. Fueron identificados ocho casos homocigóticos -cuatro enfermos- con más de 31 unidades de CAG en ambos alelos, que representaron el 0.46% del total de casos estudiados.

4.1.2 Penetrancia de alelos *sca2* expandidos

Se comprobó que no existen individuos que, siendo portadores de alelos *sca2* expandidos con más de 36 repeticiones de CAG, permanecieran clínicamente sanos a edades mayores de 63 años, lo que indicó que los alelos *sca2* expandidos tienen una penetrancia completa para el rango de 37 a 79 repeticiones de CAG. Sin embargo, se identificaron tres individuos cuyas edades superan el límite de esperanza de vida establecida para la población de origen, y que permanecieron asintomáticos siendo portadores de alelos *sca2* expandidos en el rango de 32 a 36 repeticiones de CAG. Estos individuos eran de sexo masculino y pertenecían a tres familias SCA2 diferentes (Anexo 3). La estimación de la penetrancia dependiendo del número de repeticiones de CAG se muestra en la tabla 2. Se observó que la penetrancia de alelos *sca2* expandidos tiende a aumentar con el incremento del número de repeticiones de CAG; fue del 50% para alelos *sca2* con 32 repeticiones de CAG, del 83.3% para 34 CAGs, y del 97.6% para 36 CAGs. Globalmente, la penetrancia alcanzó un valor del 99.4%.

Tabla 2. Penetrancia de alelos *sca2* expandidos en las familias estudiadas.

	Número de repeticiones de CAG						Total
	32	33	34	35	36	37-79	
No. de individuos clínicamente enfermos	1	1	5	15	40	468	530
No. de individuos clínicamente sanos*	1	0	1	0	1	0	3

* Hombres >75 y mujeres > 79.3 años de edad.

4.1.3 Inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* normales largos. Mutaciones *de novo*

En la muestra estudiada los alelos *sca2* normales largos variaron entre 25 y 31 unidades de CAG, y tuvieron un valor promedio y desviación estándar de 28.2 ± 1.95 repeticiones de CAG. Se observó inestabilidad de la secuencia repetitiva de CAG en 28 de las 74 transmisiones analizadas (37.84%). Los cambios intergeneracionales variaron entre -1 y +2 unidades de CAG, con un valor promedio y desviación estándar de 1.07 ± 0.72 unidades; las expansiones fueron 2.5 veces más frecuentes que las contracciones. Los alelos más inestables fueron los de 28 repeticiones de CAG (6/7; 85.7%), mientras que los menos inestables fueron los de 25 unidades (1/12; 8.3%); los alelos de 30 y 31 repeticiones tuvieron una frecuencia de inestabilidad del 34.8% (8/23). En las transmisiones maternas, el 45.2% (14/31) de los alelos *sca2* normales largos fueron inestables, mientras que esto se observó solo en el 32.6% (14/43) de las transmisiones paternas. No hubo asociación significativa entre la frecuencia de inestabilidad y la vía de transmisión del alelo normal largo, ni entre esta última y la proporción de expansiones *versus* contracciones.

Sólo en ocho de las familias estudiadas se observó inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* normales largos (8/17; 47.1%). Entre estas familias, la magnitud promedio de la inestabilidad intergeneracional varió entre -0.5 y 1.0 unidades de CAG.

En tres de las familias estudiadas, alelos con 30 o 31 repeticiones de CAG fueron transmitidos repetidamente de manera estable. Particularmente, en la familia F117 se obtuvieron evidencias de estabilidad intergeneracional de un alelo con 30 repeticiones de CAG a través de al menos dos generaciones (Figura 3-A). En esta familia, el individuo V-1, de sexo masculino, transmitió un alelo con 30 repeticiones de CAG a cada uno de sus descendientes (VI-2, 3, 4, 5), mientras que su primer hija (VI-2) transmitió este alelo de modo estable a su descendiente (VII-1).

Por el contrario, en la familia F1 se observó inestabilidad intergeneracional de alelos con más de 28 repeticiones de CAG. Significativamente, se observó la ocurrencia de mutaciones *de novo* en las transmisiones del individuo IV-5 a sus descendientes V-1 y V-2 y, probablemente, en la transmisión del individuo III-2 a su descendiente IV-2 (Figura 3-B).

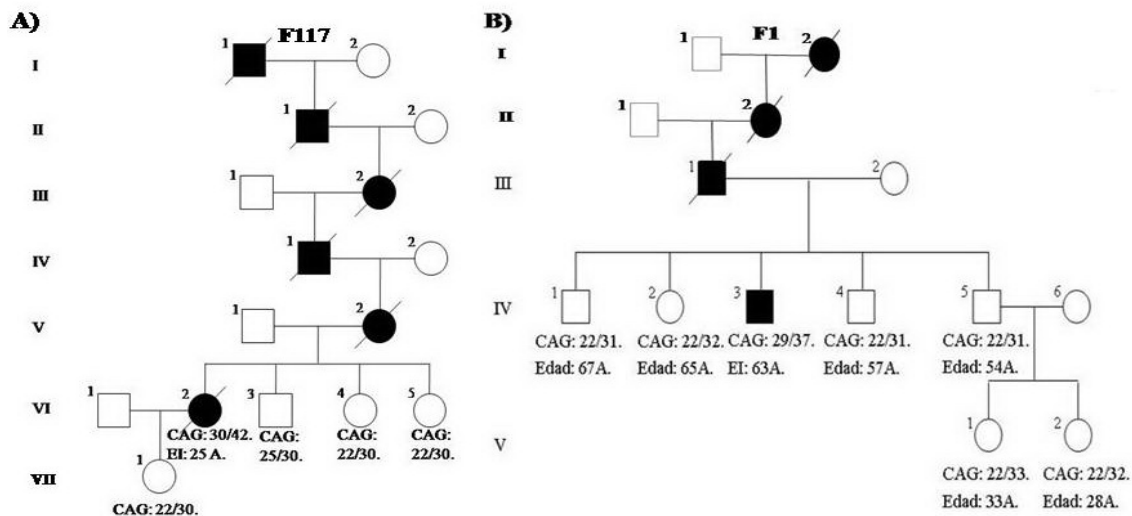


Figura 3. Comportamiento intergeneracional de alelos *sca2* normales largos en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. A) Comportamiento estable de un alelo *sca2* normal largo con 30 repeticiones de CAG durante su transmisión intergeneracional en la familia F117. B) Inestabilidad intergeneracional en la transmisión de alelos con más de 28 repeticiones de CAG en la familia F1: los alelos *sca2* con 32-33 repeticiones de CAG en los individuos V-1 y V-2 resultaron de mutaciones *de novo* a partir de un alelo normal largo de su progenitor. *Abreviatura:* EI- edad de inicio de la enfermedad.

4.1.4 Inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos

El análisis de la transmisión intergeneracional de los alelos *sca2* expandidos en pares progenitor-descendiente ofrece información acerca de la variación en la línea germinal de los progenitores, como fuera revelado por las variantes alélicas presentes en la descendencia. En la muestra analizada, los alelos *sca2* expandidos tuvieron una media aritmética y desviación estándar de 38.4 ± 2.33 repeticiones de CAG. En la tabla 3 aparece resumida la información relativa a la variación de la secuencia repetitiva de CAG durante su transmisión intergeneracional en las familias estudiadas.

En el 76.4% (172/225) de las transmisiones analizadas ocurrió inestabilidad de alelos *sca2* expandidos, donde la ocurrencia de expansiones fue 4.73 veces mayor que la de contracciones de la secuencia repetitiva de CAG. El cambio intergeneracional tuvo una magnitud promedio de

+2.08 unidades de CAG, y varió en un rango de -14 a +38 unidades. No hubo diferencias significativas en cuanto a la magnitud de expansiones y contracciones ($t=-1.05$; $p=0.30$).

Tabla 3. Transmisión de la secuencia repetitiva de CAG de alelos *sca2* expandidos en las familias estudiadas.

	Total	Vía de transmisión	
		Paterna	Materna
Número de transmisiones (%)	225 (100)	107 (47.6)	118 (52.4)
(CAG) _{exp} -progenitores (media±D.E)	38.4±2.33	38.4±2.32	38.4±2.35
Edad conceptiva-progenitores (media±D.E; rango)	26.9±6.90; 14 a 51	28.6±6.69; 16 a 51	25.3±9.32; 14 a 45
Frecuencia de Inestabilidad n (%)	172 (76.4)	94 (87.9)	78 (66.1)
Expansiones	142 (63.1)	76 (71.0)	66 (55.9)
Contracciones	30 (13.3)	18 (16.8)	12 (10.2)
Magnitud de la Inestabilidad (media; rango)	2.08; -14 a 38	3.10; -14 a 38	1.16; -6 a 11
Expansiones	3.93; 1 a 38	5.18; 1 a 38	2.48; 1-11
Contracciones	-2.97; -14 a -1	-3.44; -14 a -1	-2.25; -6 a -1

Abreviaturas: (CAG)_{exp}- número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos; n- número de observaciones; D.E- desviación estándar.

La direccionalidad de la inestabilidad intergeneracional no estuvo asociada a la vía de transmisión de alelos *sca2* expandidos. Sin embargo, la transmisión paterna difirió significativamente de la materna en cuanto a la magnitud de la inestabilidad ($t=3.13$; $p=0.002$), incluso después de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ($p=0.009$). Esta diferencia en magnitud se debe exclusivamente a las expansiones, por cuanto estas mostraron diferencias altamente significativas entre las transmisiones paternas y maternas ($t=4.19$; $p<0.001$) -mantenida incluso después de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ($p=0.005$)-, no así las contracciones ($p=0.29$).

4.1.4.1 Efecto del número de repeticiones de CAG de los alelos *sca2* expandidos transmitidos y de la edad conceptiva sobre la inestabilidad intergeneracional

En transmisiones paternas de alelos *sca2* expandidos, se encontró asociación significativa entre la magnitud de la inestabilidad intergeneracional y el número de repeticiones de CAG en estos alelos ($r=0.32$; $p=0.001$), incluso después de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ($p=0.005$), no así en el caso de las transmisiones maternas.

No se encontró asociación significativa entre la edad conceptiva y la magnitud de la inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos en transmisiones paternas o maternas. Sin embargo, se obtuvo una correlación altamente significativa entre la edad conceptiva materna y el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos de los descendientes ($r=-0.35$; $p<0.001$), incluso después de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ($p<0.001$); no así para la edad conceptiva paterna. Se obtuvo que la vía de transmisión de la mutación, así como su interacción con el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos y con la edad conceptiva, tuvieron una asociación altamente significativa con la inestabilidad intergeneracional de los alelos *sca2* expandidos, que fue sostenida después de aplicada la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Figura 4).

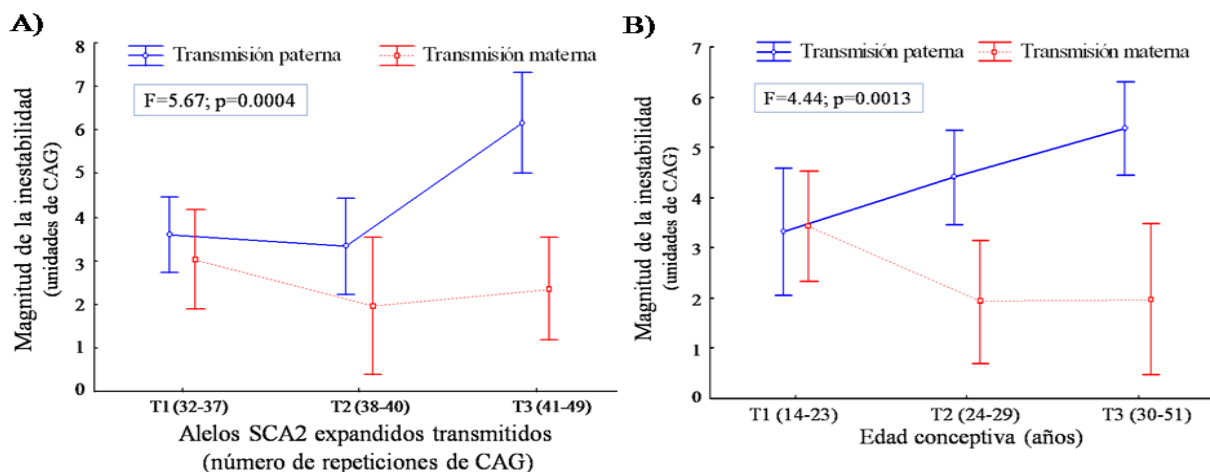


Figura 4. Análisis de varianza factorial de dos vías. A) Efecto de la interacción entre el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos y la vía de transmisión de la mutación sobre la inestabilidad intergeneracional de los alelos expandidos. B) Efecto de la interacción entre la edad conceptiva y la vía de transmisión de la mutación sobre la inestabilidad intergeneracional de los alelos

expandidos. *Abreviaturas:* T1, T2 y T3- terciles correspondientes a los alelos *sca2* expandidos transmitidos y a la edad conceptual, de acuerdo a la distribución de frecuencias para estas variables.

4.1.4.2 Efecto del sexo de los descendientes sobre la inestabilidad intergeneracional de los alelos *sca2* expandidos

Para evitar el enmascaramiento de un posible efecto del sexo de los descendientes por la fuerte influencia del sexo del progenitor sobre la inestabilidad, se analizaron las transmisiones paternas y maternas a hijos e hijas separadamente (Tabla 4).

Tabla 4. Transmisión de la secuencia repetitiva de CAG en alelos *sca2* expandidos a descendientes masculinos y femeninos de las familias estudiadas.

	Vía de transmisión			
	Paterna		Materna	
	<i>Hijos</i>	<i>Hijas</i>	<i>Hijos</i>	<i>Hijas</i>
Número de transmisiones	55	52	53	65
(CAG) _{exp} -progenitores (<i>media</i> ± <i>D.E</i>)	39.0±2.49	37.8±1.97	38.3±2.06	38.5±2.60
Frecuencia de Inestabilidad <i>n</i> (%)	50 (90.9%)	44 (84.6%)	34 (64.2%)	45 (69.2%)
<i>Expansiones</i>	42 (76.4%)	34 (65.4%)	30 (56.6%)	37 (56.9%)
<i>Contracciones</i>	8 (14.5%)	10 (19.2%)	4 (7.6%)	8 (12.3%)
Magnitud de la Inestabilidad (<i>media; rango</i>)	3.95; -14 a 38	2.21; -8 a 17	1.30; -6 a 7	1.05; -3 a 11
<i>Expansiones</i>	5.81; 1 a 38	4.41; 1 a 17	2.67; 1 a 7	2.33; 1 a 11
<i>Contracciones</i>	-3.38; -14 a -1	-3.50; -8 a -1	-2.75; -6 a -1	-2.0; -3 a -1

Se obtuvo que en las transmisiones paternas no hubo diferencias significativas entre descendientes de sexo masculino y femenino en cuanto a la magnitud de la inestabilidad ($t=1.03$; $p=0.31$), y que el sexo de los descendientes no estuvo asociado a la frecuencia de ocurrencia de expansiones o contracciones ($\chi^2 = 0.68$; $p=0.41$). Resultados similares se obtuvieron en las transmisiones maternas para la magnitud de la inestabilidad, y para la frecuencia de ocurrencia de expansiones o contracciones. Tampoco se encontró que existiera interacción significativa entre la vía de transmisión de la mutación y el sexo del descendiente, en la determinación de la magnitud de la inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos ($p=0.27$).

4.1.4.3 Familiaridad de la inestabilidad intergeneracional de los alelos *sca2* expandidos

Para valorar si la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG del gen *sca2* tiende a agregarse en las familias, evaluamos si la desviación del número de repeticiones de CAG esperado, predicho por el número de repeticiones de CAG de la descendencia sobre la base del número de repeticiones de CAG, edad conceptiva y sexo del progenitor transmisor de la mutación, estuvo correlacionado entre hermanos en las familias con SCA2 estudiadas. Múltiples pares de hermanos fueron derivados de grupos de hermanos con más de dos miembros. El análisis de 84 pares de hermanos reveló la existencia de una correlación significativa entre hermanos ($r=0.44$; $p<0.001$), incluso una vez aplicada la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples ($p<0.001$). El coeficiente de correlación intraclase fue de 0.214, y la familiaridad de la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG en alelos *sca2* expandidos fue del 42.8%.

4.2 Edad de inicio y riesgo bayesiano dependiente de la edad

En la muestra estudiada de 748 individuos con SCA2, la edad de inicio varió entre los 2 y los 68 años, y tuvo una media aritmética y desviación estándar de 32.5 ± 13.8 años; la mediana fue de 31 años. La distribución de frecuencias correspondiente a esta variable tuvo una asimetría (D.E) de 0.33 (0.09), y una curtosis (D.E) de -0.56 (0.18). La no normalidad de la distribución de la edad de inicio fue confirmada a través de la prueba de Shapiro-Wilk ($SW-W=0.97$; $p<0.001$); sin embargo, la inspección visual de la distribución sugiere una muy cercana proximidad a la normalidad (Figura 5-A). El cálculo de la frecuencia acumulada para la edad de inicio mostró que el 50.0% de los sujetos estudiados enfermó antes de los 31 años de edad; el 20.0% enfermó antes de los 20 años de edad (juveniles), mientras que el 99.0% fue sintomático antes de los 63 años de edad (Figura 5-B).

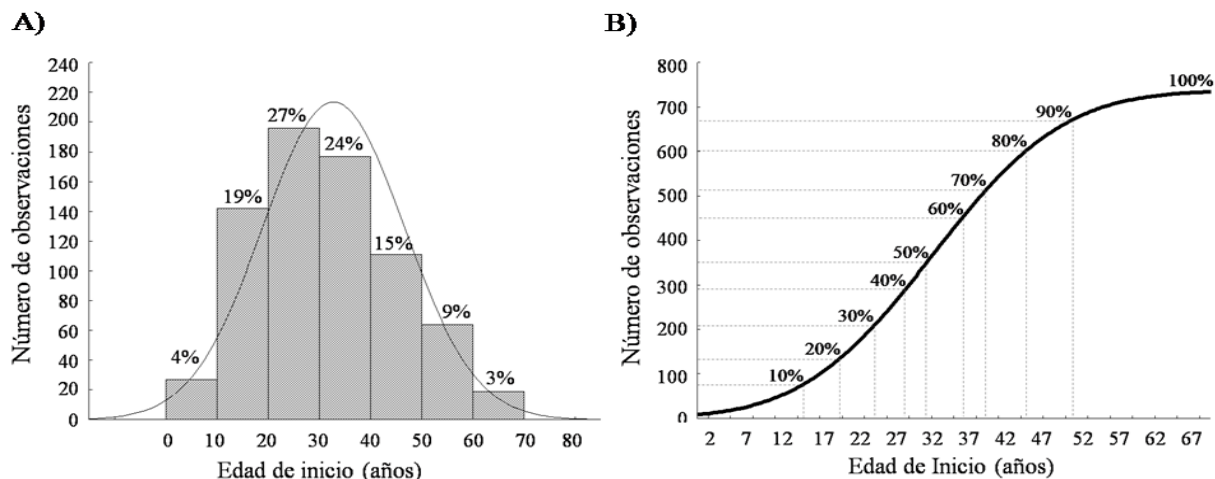


Figura 5. Distribuciones de frecuencias para la edad de inicio en pacientes con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 ($n=748$). A) Distribución de frecuencias absolutas. B) Distribución de frecuencias acumulativas.

El 51.1% de los individuos estudiados pertenecieron al género masculino y tuvieron una edad de inicio media y desviación estándar de 31.8 ± 13.9 años. Como promedio, manifestaron los primeros síntomas de enfermedad un año antes que las mujeres, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($t = -1.51$; $p = 0.132$).

4.2.1 Riesgo bayesiano dependiente de la edad para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

El cálculo del riesgo bayesiano para individuos asintomáticos con un riesgo *a priori* del 50% de enfermar clínicamente, indicó la existencia de una progresiva disminución del riesgo a medida que avanza la edad del individuo (Tabla 5). Mientras que para individuos con siete años de edad o menos, el riesgo sigue siendo del 50%, los individuos con 25 a 35 años de edad tienen un riesgo que varía entre el 39 y 27%, mientras que para los casos de 65 años de edad o más, el riesgo disminuye hasta aproximadamente un cero por ciento.

Tabla 5. Tabla de vida para la estimación del riesgo genético en individuos asintomáticos con un riesgo *a priori* del 50% para la SCA2.

Edad (años)	Riesgo (%)	Edad (años)	Riesgo (%)	Edad (años)	Riesgo (%)
≤ 7	50	30-31	33	48	14
8-12	49	32	32	49	12
13-15	48	33	31	50	10
16-17	47	34	29	51-52	9
18	46	35	27	53	8
19	45	36	26	54-55	7
20	44	37	25	56	6
21	43	38-39	24	57	5
22-23	42	40	21	58-59	4
24	41	41	20	60	3
25-26	39	42-43	19	61	2
27	38	44	18	62-64	1
28	37	45-46	16	≥ 65	~ 0
29	36	47	15		

El cálculo del riesgo bayesiano para individuos asintomáticos con un riesgo *a priori* del 25% también indicó la existencia de una progresiva disminución del riesgo genético a medida que avanza la edad del individuo (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla de vida para la estimación del riesgo genético en individuos asintomáticos con un riesgo *a priori* del 25% para la SCA2.

Edad (años)	Riesgo (%)	Edad (años)	Riesgo (%)
≤9	25	35-36	11
10-14	24	37-38	10
15-17	23	39	9
18	22	40-41	8
19	21	42-44	7
20-22	20	45-47	6
23-24	19	48	5
25	18	49-50	4
26-27	17	51-54	3
28-29	16	55-57	2
30-31	14	58-61	1
32-33	13	≥63	~ 0
34	12		

Mientras que los individuos asintomáticos con un riesgo *a priori* del 25% y nueve o menos años de edad mantienen un riesgo del 25%, los individuos de 25 a 35 años de edad tienen un riesgo

que va del 18% al 11%. El riesgo para estos individuos disminuye hasta aproximadamente un cero por ciento a la edad de 63 años o más (Tabla 6).

4.3 Factores genéticos y fisiológicos que modifican el fenotipo clínico de la enfermedad

Fue considerado el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos y normales, la dosis genética, polimorfismos en genes no alélicos, el sexo, la edad y el tiempo de evolución, como factores genéticos y fisiológicos candidatos a modificadores del fenotipo clínico de la enfermedad. Se consideraron la edad de inicio, la duración de la vida, la duración de la enfermedad, la puntuación total de ataxia, la velocidad sacádica máxima y la latencia sacádica a 10°, 20°, 30° y 60°, y la tasa de progresión de la enfermedad, como marcadores del fenotipo clínico. La estadística descriptiva de estas variables se resume en el anexo 4.

4.3.1 Fenotipo clínico y número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

4.3.1.1 Edad de inicio de la enfermedad *versus* número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

A través de análisis de regresión simple y múltiple se obtuvo una asociación altamente significativa entre la edad de inicio y el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos. El modelo de regresión simple que mejor se ajustó a los datos fue de tipo exponencial (Figura 6-A). Adicionalmente se obtuvo un modelo bi-segmentado por regresión lineal múltiple que explicó mejor la relación existente entre la edad de inicio y el número de repeticiones de CAG (*ver epígrafe 3.13*) (Figura 6-B). Obtuvimos el mayor incremento en el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) (de 0.61 a 0.64; $\Delta R^2_{aj}=0.03$; $p<0.001$) para 45 repeticiones de CAG; el error estándar del residual se redujo de 0.20 a 0.017. No hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres para la edad de inicio una vez ajustada al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos ($p>0.05$).

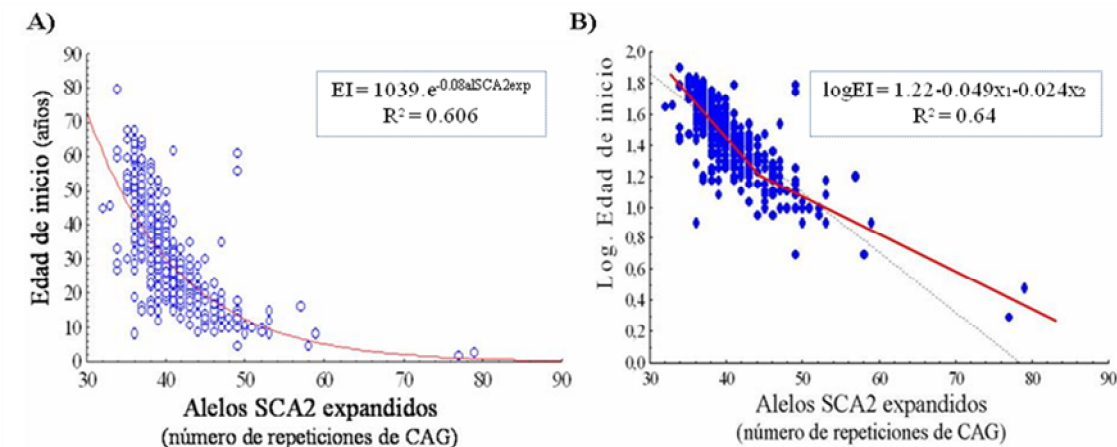


Figura 6. Diagramas de dispersión que muestran la relación existente entre la edad de inicio de la enfermedad (EI) y la longitud de alelos *sca2* expandidos (alSCA2exp) ($n=530$). A) Modelo exponencial en el que puede apreciarse la existencia de una relación curvilínea entre las variables en estudio. B) Modelo de regresión lineal bi-segmentado donde la edad de inicio transformada logarítmicamente es ploteada contra el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos. La línea punteada representa el modelo de regresión lineal con mejor ajuste a los datos. La línea sólida representa el modelo de regresión lineal múltiple con mejor ajuste a los datos, con el punto de inflexión en 45 unidades de CAG. Se muestran las correspondientes ecuaciones de regresión.

4.3.1.1.1 Probabilidad de enfermar a una edad determinada para un número de repeticiones de CAG específico en alelos *sca2* expandidos

De los 961 individuos que conforman la muestra utilizada para la determinación de la penetrancia de alelos *sca2* expandidos, 924 tuvieron más de 31 repeticiones de CAG en sus alelos expandidos. De estos, 867 (93.8%) individuos tienen alelos *sca2* cuyas secuencias repetitivas de CAG varían entre las 34 y 45 unidades. A partir de esta muestra se realizó un análisis de supervivencia para estimar la probabilidad que un individuo tiene de enfermar a una edad determinada para un número de repeticiones de CAG específico. La probabilidad acumulativa para la manifestación de la enfermedad, a intervalos de cinco años y para un número de repeticiones de CAG específico, es mostrada en el anexo 5.

Se obtuvo que a medida que el número de repeticiones de CAG aumentó de 34 a 45 unidades, hubo un incremento altamente significativo en la probabilidad de manifestar la enfermedad a una edad determinada ($p < 0.001$). Mientras un individuo con 36 repeticiones de CAG tuvo una probabilidad del ocho por ciento de haber enfermado hacia los 35 años de edad, la probabilidad aumenta hasta un 25% para aquellos con 38 unidades repetitivas de CAG, y hasta un 82% para individuos con 42 repeticiones de CAG (Anexo 5). Además se encontró que, por ejemplo, el 50% de los individuos con 35 repeticiones de CAG habrá enfermado hacia los 60 años de edad, mientras que el 50% de aquellos con 45 repeticiones de CAG habrá enfermado hacia los 18 años de edad (Tabla 7).

Tabla 7. Media y cuartiles para la edad de inicio en individuos con 34 a 45 unidades repetitivas de CAG ($n=867$).

Número de repeticiones de CAG	Edad de Inicio media (I.C 95%) (años)	Cuartiles para la Edad de Inicio (I.C 95%) (años)		
		Q ₁	Q ₂	Q ₃
34	68.8 (61.9-75.8)	62 (27-97)	-	-
35	60.8 (57.9-63.6)	55 (52-58)	60 (55-65)	68 (ND)
36	53.7 (50.3-57.0)	49 (41-57)	53 (50-56)	62 (58-66)
37	48.5 (46.6-50.3)	42 (40-44)	49 (48-50)	55 (51-59)
38	43.3 (40.7-45.9)	35 (32-38)	42 (39-45)	56 (50-62)
39	36.1 (34.1-38.0)	30 (28-32)	36 (34-38)	40 (37-43)
40	34.5 (32.3-36.6)	29 (26-32)	34 (31-37)	40 (36-42)
41	36.3 (32.3-40.4)	25 (23-27)	30 (27-33)	62 (41-83)
42	30.1 (25.8-34.5)	23 (20-26)	25 (24-26)	30 (25-35)
43	23.5 (21.2-25.7)	19 (18-20)	20 (18-22)	28 (26-30)
44	23.3 (19.6-26.9)	19 (16-22)	21 (19-23)	28 (21-35)
45	23.2 (15.8-30.6)	13 (10-16)	18 (11-25)	30 (18-42)

Abreviaturas: Q₁- primer cuartil (edad a la cual estará afectado el 25% de los individuos); Q₂- segundo cuartil (edad a la cual estará afectado el 50% de los individuos); Q₃- tercer cuartil (edad a la cual estará afectado el 75% de los individuos); I.C 95%- intervalo de confianza del 95%.

Se observó que una diferencia de tan sólo una unidad de CAG tuvo un efecto significativo sobre la edad de inicio estimada para un individuo determinado ($p < 0.001$). Se obtuvo una correlación lineal altamente significativa entre el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

y la edad de inicio media ($r^2=-0.98$; $p<0.001$), el primer ($r^2=-0.84$; $p<0.001$), segundo ($r^2=-0.991$; $p<0.001$) y tercer ($r^2=-0.998$; $p<0.001$) cuartiles para la edad de inicio. La edad de inicio media disminuyó 4.15 ± 3.45 años por cada incremento de una unidad en el número de repeticiones de CAG en el rango de 34 a 45 unidades. En igual rango, la edad de inicio mediana (Q_2) disminuyó 4.20 ± 2.44 años por cada incremento en el número de repeticiones de CAG.

4.3.1.2 Duración de la vida y duración de la enfermedad *versus* número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

La duración de la vida en los hombres ($n=46$) fue de 46.4 años como promedio, mientras que en las mujeres ($n=53$) fue de 47.4 años; esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Se comprobó que tampoco existió diferencia significativa para la duración de la enfermedad entre hombres y mujeres. Se obtuvo una asociación negativa altamente significativa entre la duración de la vida y el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos (Figura 7-A); resultados similares se obtuvieron para la duración de la enfermedad (Figura 7-B).

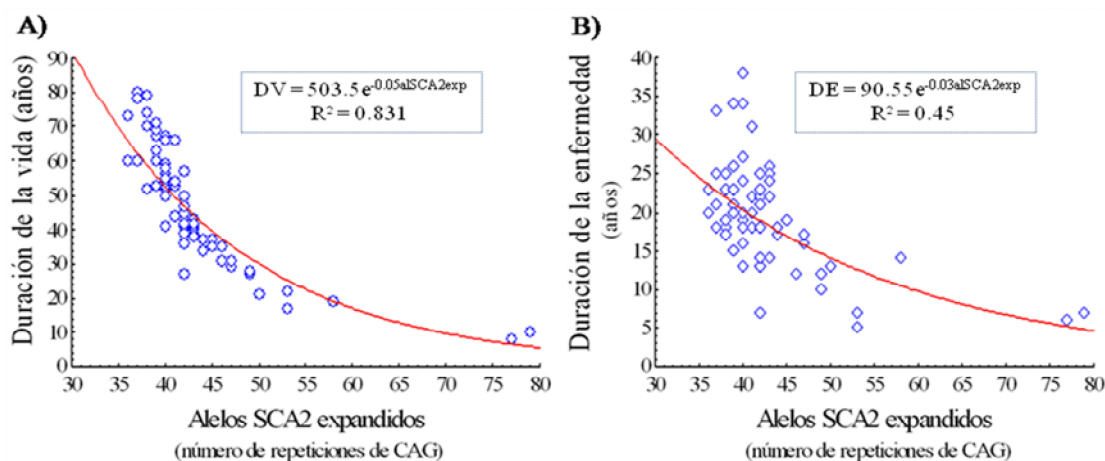


Figura 7. Diagramas de dispersión para: A) Duración de la vida (DV) *versus* número de repeticiones de CAG (alSCA2exp) ($n=69$), B) duración de la enfermedad (DE) *versus* número de repeticiones de CAG ($n=69$). En ambos casos puede ser apreciada la existencia de una relación curvilínea entre las variables. Se muestran las correspondientes ecuaciones de regresión.

Los individuos con 36 o 37 repeticiones de CAG fallecieron a los 60 años de edad o más tarde, mientras que aquellos con 50 repeticiones de CAG o más, fallecieron antes de los 25 años de edad. De modo similar, los individuos con 36 o 37 repeticiones de CAG vivieron hasta 18-33 años desde el debut de la enfermedad, mientras que aquellos con 50 repeticiones de CAG o más, vivieron hasta 5-14 años desde el debut de la enfermedad.

4.3.1.3 Puntuación total de ataxia *versus* número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

La puntuación total de ataxia tuvo una media y desviación estándar de 50.1 ± 17.4 unidades en el grupo de individuos con SCA2 analizados (Anexo 4). La edad de los enfermos al momento del estudio tuvo una media de 40.6 años, la edad de inicio promedio fue de 28.2 años, mientras que el tiempo de evolución promedio fue de 12.5 años; los alelos *sca2* expandidos tuvieron una media de 40.9 repeticiones de CAG. Se obtuvo que la puntuación total de ataxia estuvo positivamente asociada al tiempo de evolución ($r=0.57$; $p<0.001$) y, en mucho menor grado, al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos ($r=0.24$; $p=0.006$) (Figura 9-A y -B, respectivamente).

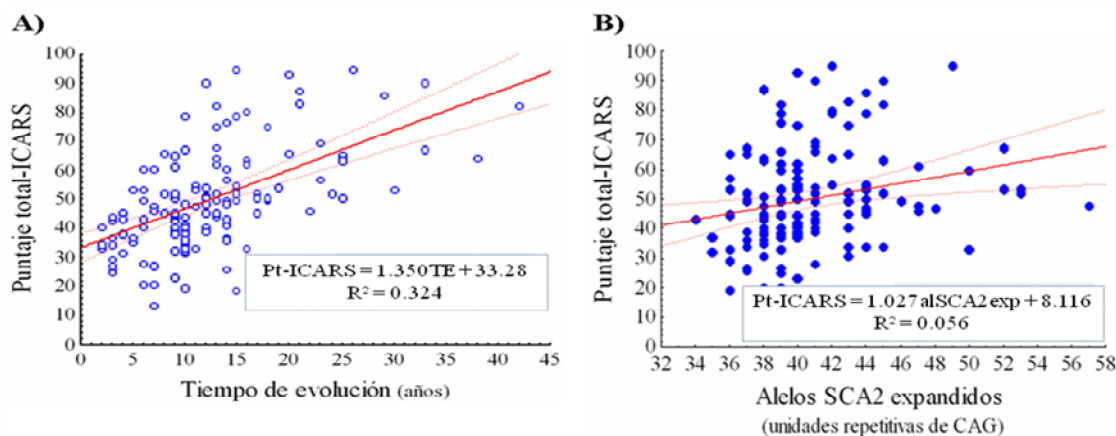


Figura 9. Diagramas de dispersión para: A) Puntuación total de ataxia (Pt-ICARS) *versus* tiempo de evolución (TE) ($n=135$), B) Puntuación total ataxia *versus* número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos (alSCA2) ($n=135$). Las líneas discontinuas a ambos lados de las curvas de regresión representan las bandas de regresión para un intervalo de confianza del 95%. Se muestran las correspondientes ecuaciones de regresión.

No se encontró correlación significativa entre la puntuación total de ataxia y la edad al momento del examen. A través de un análisis de regresión múltiple se obtuvo que la conjunción del tiempo de evolución y del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos, explicó el 43.4% de la variabilidad observada para la puntuación total de ataxia.

4.3.1.4 Velocidad sacádica máxima y latencia sacádica *versus* número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

La estadística descriptiva correspondiente a la velocidad sacádica máxima y a la latencia sacádica en los enfermos estudiados se muestra en el anexo 4. En este grupo, el tiempo de evolución tuvo una media y desviación estándar de 13.9 ± 8.49 años, y los alelos *sca2* expandidos tuvieron un promedio y desviación estándar de 40.4 ± 3.39 repeticiones de CAG. Se obtuvo una asociación moderada y altamente significativa entre el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos y la velocidad sacádica máxima a 10° , 20° , 30° y 60° ; el mejor ajuste entre estas variables se obtuvo para los 60° (Figura 10).

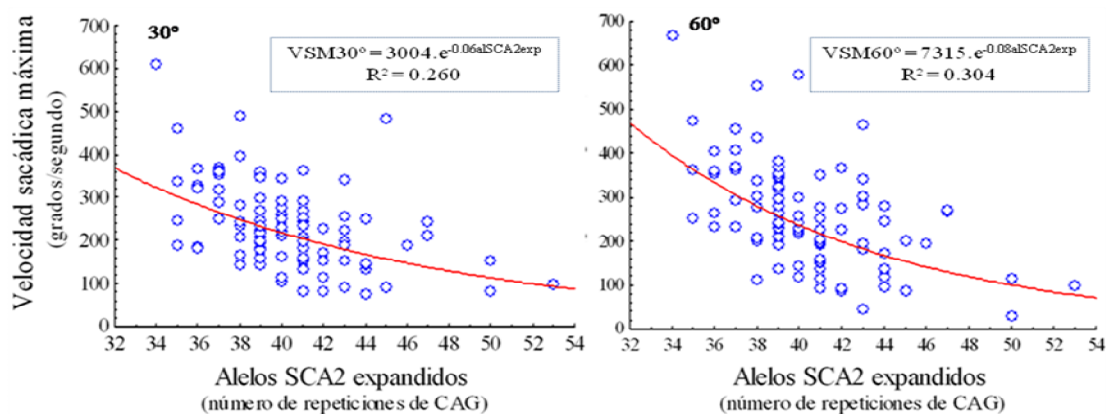


Figura 10. Velocidad sacádica máxima (VSM) a 30° y 60° *versus* número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos (alSCA2exp) ($n=94$). Puede ser apreciada la existencia de una relación curvilínea entre las variables. Se muestran las correspondientes ecuaciones de regresión.

La latencia sacádica no tuvo correlación significativa con el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos. Se obtuvo que ni la edad ni el tiempo de evolución estuvieron

significativamente asociados a la latencia sacádica o a la velocidad sacádica máxima a 10°, 20°, 30° o 60° ($p > 0.05$), y que no existieron diferencias significativas entre hombres ($n=57$) y mujeres ($n=37$) para la latencia sacádica, o la velocidad sacádica máxima incluso después de ajustada al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos ($p > 0.05$).

4.3.1.5 Tasa de progresión de la enfermedad *versus* número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

La estadística descriptiva correspondiente a la tasa de progresión de la enfermedad en los individuos enfermos estudiados se muestra en el anexo 4. La estadística descriptiva correspondiente a la edad de los enfermos al momento del estudio, el tiempo de evolución y los alelos *sca2* expandidos, fue puntualizada en el epígrafe 4.3.1.4.

Se obtuvo que el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos estuvo significativamente asociado a la puntuación total de ataxia/edad del individuo (Figura 11-A), y a la puntuación total de ataxia/tiempo de evolución de la enfermedad, aunque en este último caso la asociación fue muy débil (Figura 11-B).

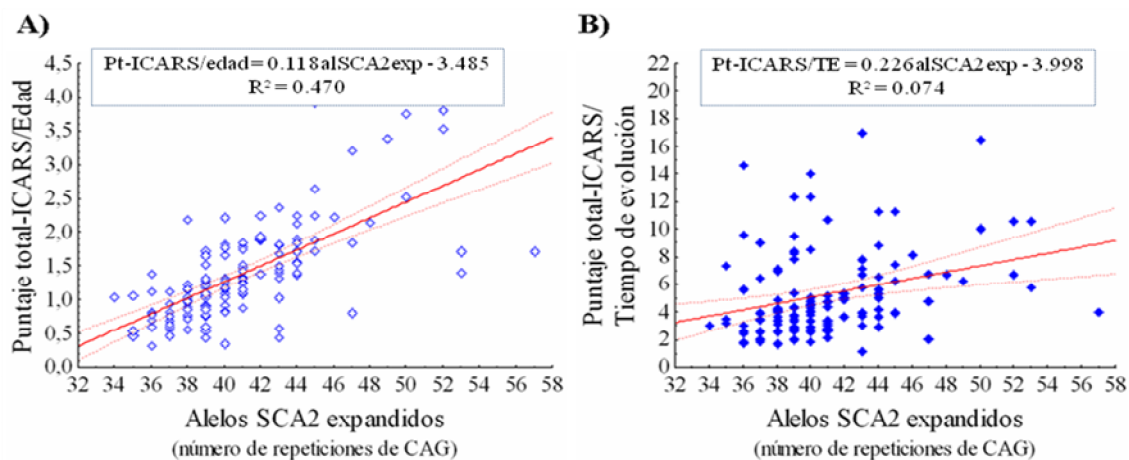


Figura 11. Tasa de progresión de la enfermedad *versus* número de repeticiones de CAG (alSCA2exp) ($n=135$). A) Puntuación total de ataxia ajustada a la edad del individuo *versus* número de repeticiones de CAG. B) Puntuación total de ataxia ajustada al tiempo de evolución de la enfermedad *versus* número de repeticiones de CAG. Se muestran las correspondientes ecuaciones de regresión.

Se comprobó que la enfermedad tuvo una tasa de progresión similar entre hombres y mujeres para la puntuación total de ataxia/edad del individuo. Sin embargo, para la puntuación total de ataxia/tiempo de evolución, la tasa de progresión fue significativamente menor en hombres que en mujeres (4.60 ± 2.41 vs. 6.06 ± 4.04 ; $p=0.014$). Esta diferencia entre hombres y mujeres se sostuvo incluso después de ajustar la puntuación total de ataxia/tiempo de evolución, al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos ($t=-2.77$; $p=0.006$).

4.3.2 Influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y del genotipo *sca2* sobre el fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Se evaluó la posible influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y del genotipo *sca2* sobre el fenotipo clínico de la enfermedad, a través de análisis de regresión lineal múltiple considerando al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y expandidos, y al genotipo para el gen *sca2*, como variables independientes.

Del análisis de regresión lineal múltiple considerando al logaritmo de la edad de inicio como variable dependiente, se obtuvo que para los alelos *sca2* expandidos el valor del coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.607 ($p<0.0001$). Luego, el 60.7% de la varianza de la edad de inicio en la muestra estudiada se debió al número de repeticiones de CAG de los alelos expandidos. La adición del número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales mejoró moderadamente el coeficiente de determinación, explicando entonces el 61.0% de la variabilidad de la edad de inicio; el genotipo *sca2*, operacionalizado como variable cuantitativa o cualitativa, no tuvo una influencia significativa sobre la edad de inicio.

De acuerdo a este modelo, tan solo el 0.3% de la varianza total de la edad de inicio puede ser atribuida al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales, mientras que el 0.76% de la varianza de la edad de inicio no explicada por el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, puede ser interpretada en términos del número de repeticiones de CAG en los alelos normales (Tabla 8; Modelo 2). Se evidenció que los alelos *sca2* expandidos y

normales tienen efectos opuestos sobre la edad de inicio de la enfermedad; el incremento en el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales implicó un debut clínico más tardío.

La influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales sobre la edad de inicio también fue corroborada a través de un análisis de regresión lineal múltiple a partir del modelo bi-segmentado anteriormente abordado en el epígrafe 4.3.1.1. La adición del número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales mejoró el coeficiente de determinación, explicando entonces el 64.2% de la variabilidad de la edad de inicio (Tabla 8; Modelo 4); el genotipo *sca2*, operacionalizado como variable cuantitativa o cualitativa, no tuvo una influencia significativa sobre la edad de inicio.

Tabla 8. Influencia de los alelos *sca2* normales sobre la edad de inicio y progresión de la enfermedad.

Modelo	Variables Dependientes	Variables explicativas	R ²	ΔR ²	Varianza no explicada de la edad de inicio	P
1	logEI	alSCA2 _{exp}	0.607	-	-	<0.001
2		alSCA2 _{exp} + alSCA2 _n	0.61	0.003	0.76	<0.001
3	logEI	X ₁ + X ₂	0.638	-	-	<0.001
4		X ₁ + X ₂ + alSCA2 _n	0.642	0.004	1.10	<0.001
5	ICARS/TE	alSCA2 _{exp}	0.075	-	-	<0.001
6		alSCA2 _{exp} + alSCA2 _n	0.126	0.051	5.51	<0.001

Abreviaturas: logEI- edad de inicio con transformación logarítmica; ICARS/TE- puntuación total de ataxia ajustada al tiempo de evolución; alSCA2_{exp}- número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos; alSCA2_n- número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales; R²- coeficiente de determinación; ΔR²- diferencia en el coeficiente de determinación; p- nivel de significación estadística.

De acuerdo con este modelo, el 0.4% de la varianza total de la edad de inicio puede ser atribuida al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales, mientras que el 1.1% de la varianza de la edad de inicio no explicada por el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, puede ser explicada por el número de repeticiones de CAG en los alelos normales. También aquí se evidenció que el incremento en el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales implicó una manifestación más tardía de la enfermedad; una vez ajustada la

edad de inicio al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, los individuos con 22 repeticiones de CAG o más en sus alelos normales enfermaron a edades significativamente más tardías que aquellos con menos de 22 repeticiones de CAG ($p= 0.009$).

Se encontró que ni el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales ni el genotipo *sca2* tuvieron influencia significativa sobre la duración de la vida o sobre la duración de la enfermedad. Resultados similares se obtuvieron para las puntuaciones totales de ataxia una vez ajustadas al tiempo de evolución y al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, para la velocidad sacádica máxima y para la latencia sacádica a 10°, 20°, 30° y 60°, y para la tasa de progresión de la enfermedad expresada en forma de la puntuación total de ataxia ajustada a la edad del individuo ($p>0.05$).

Sin embargo, el número de unidades de CAG en los alelos *sca2* normales tuvo una influencia significativa sobre la tasa de progresión de la enfermedad expresada como la puntuación total de ataxia ajustada al tiempo de evolución. La inclusión de esta variable en el modelo de regresión representado en la figura 11-B, mejoró significativamente el coeficiente de determinación, explicando entonces el 12.6% de la variabilidad de la puntuación total de ataxia ajustada al tiempo de evolución de la enfermedad. Luego, el 5.51% de la varianza de la puntuación total de ataxia ajustada al tiempo de evolución, no explicada por el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, puede ser interpretada en función de la variación del número de repeticiones de CAG en los alelos normales (Tabla 8; Modelo 6). Según este modelo, los alelos *sca2* expandidos y normales tienen efectos opuestos sobre la tasa de progresión de la enfermedad; el incremento en el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales implicó una disminución en la tasa de progresión de la enfermedad.

4.3.3 Efecto de la dosis genética sobre el fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

La información genealógica correspondiente a los casos identificados como homocigóticos para alelos *sca2* expandidos se muestra en el anexo 6. La estadística descriptiva para las variables clínicas relativas a los casos incluidos en el estudio se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Estadística descriptiva para variables clínicas en individuos homocigóticos y heterocigóticos con 34, 35 o 41 repeticiones de CAG en sus alelos *sca2* expandidos.

Variables clínicas	Genotipos para el gen <i>sca2</i> (número de repeticiones de CAG)					
	34/34	x/34	35/35	x/35	33/41	x/41
EI (años)						
<i>n</i>		4		14		49
Rango	57 ¹ , 61 ²	29-62	51	50-68	13	15-41
Media±D.E		46.0±17.42		58.1±5.60		26.5±5.72
I.C 95%		18.3-73.7		54.9-61.4		24.8-28.1
DV (años)		ND	ND	ND		
<i>n</i>						26
Rango	80 ¹				35	27-67
Media±D.E						50.8±9.54
I.C 95%						46.9-54.7
DE (años)		ND	ND	ND		
<i>n</i>						26
Rango	23 ¹				22	7-38
Media±D.E						20.9±6.59
I.C 95%						18.3-23.6
Pt-ICARS	ND	ND			ND	ND
<i>n</i>				11		
Rango			75	19-65		
Media±D.E				40.5±13.7		
I.C 95%				31.3-49.6		
VSM 60° (grados/segundo)	ND	ND				
<i>n</i>				9		31
Rango			235.0	231-668.5	265.5	86.0-577.5
Media±D.E				361.7±141.4		218.2±101.6
I.C 95%				252.9-470.4		180.9-255.4
Lat 60° (milisegundos)	ND	ND				
<i>n</i>				9		31
Rango			291.0	117.0-354.0	293.0	56.0-876.0
Media±D.E				226.4±69.74		286.6±153.9
I.C 95%				172.8-280.1		230.1-343.0
Pt-ICARS/Edad	ND	ND			ND	ND
<i>n</i>				11		
Rango			1.27	0.32-1.13		
Media±D.E				0.75±0.26		
I.C 95%				0.58-0.93		

Abreviaturas: EI- edad de inicio, DV- duración de la vida; DE- duración de la enfermedad; Pt- ICARS- puntuación total de ataxia; VSM- velocidad sacádica máxima; Lat- latencia sacádica; n- tamaño muestral; D.E- desviación estándar; I.C- intervalo de confianza, ND- no determinado; x- alelo *sca2* normal con 13 a 31 repeticiones de CAG; ¹ y ²- correspondientes a los casos 1 y 2 respectivamente.

Los dos individuos homocigóticos con genotipos de 34/34 repeticiones de CAG (casos 1 y 2) tuvieron edades de inicio incluidas en el intervalo definido por los límites de confianza del 95% para individuos heterocigóticos con 34 unidades de CAG en sus alelos *sca2* expandidos (Tabla 9). Por el contrario, los homocigóticos con genotipos de 35/35 (caso 3) o 33/41 (caso 4) repeticiones de CAG, enfermaron a edades más tempranas que lo esperado en comparación con individuos heterocigóticos (Tabla 9).

Adicionalmente, el caso 3 tuvo una puntuación total de ataxia, una latencia sacádica a 60° y una tasa de progresión de la enfermedad expresada como la puntuación total de ataxia/edad, de mayor magnitud que lo esperado en comparación con individuos heterocigóticos, y una velocidad sacádica máxima a 60° de menor magnitud que lo esperado (Tabla 9). El caso 4 tuvo una duración de la vida menor que el límite inferior del intervalo de confianza del 95% para individuos heterocigóticos con 41 unidades de CAG en sus alelos *sca2* expandidos; sin embargo, no se diferenció de los individuos heterocigóticos en cuanto a la duración de la enfermedad o la latencia sacádica a 60° e, incluso, tuvo una velocidad sacádica máxima a 60° de mayor magnitud que lo esperado (Tabla 9).

4.3.4 Componentes genético y ambiental de la varianza residual de la edad de inicio

En los 336 pares de hermanos estudiados, la correlación estimada para la edad de inicio residual - una vez ajustada al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales y expandidos-, fue de 0.2395 ($p < 0.001$). Por tanto, la familiaridad de esta varianza residual de la edad de inicio fue del 47.9%, significando que ~48% de la varianza residual en la edad de inicio es atribuible a factores genéticos independientes del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y expandidos, y a factores ambientales compartidos por los familiares estudiados. Este resultado implica que el 52.1% de tal varianza residual es atribuible a factores ambientales no compartidos por los familiares estudiados.

4.3.5 Genes modificadores del fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

La estadística descriptiva correspondiente a la edad de inicio de la enfermedad, al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y expandidos, y al genotipo *sca2* para los grupos “prematureo” y “tardío”, y para la muestra a partir de la cual estos grupos fueron conformados, se presenta en la tabla 10. Se verificó la existencia de diferencias altamente significativas para la edad de inicio entre los grupos “prematureo” y “tardío” ($p < 0.001$), si bien no existieron diferencias significativas para el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales, expandidos, o para el genotipo *sca2* ($p > 0.05$).

Tabla 10. Estadística descriptiva correspondiente a los individuos con SCA2 incluidos en el estudio para la identificación de genes candidatos a modificadores de la edad de inicio en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

Grupo	n	Hombres	Edad de inicio		Alelos <i>sca2</i> normales		Alelos <i>sca2</i> expandidos		Genotipo <i>sca2</i>	
			Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E
Fuente	530	284	33.1	14.03	22.2	1.39	40.1	4.38	62.3	4.59
Prematureo	29	17	20.8	8.68	21.7	1.07	40.2	4.19	61.9	4.58
Tardío	21	14	42.9	13.66	21.9	0.65	40.7	3.80	62.6	3.76

Abreviaturas: n- tamaño muestral; D.E- desviación estándar.

A partir de la determinación del número de repeticiones de CAG en los genes candidatos a modificadores se identificaron sus variantes alélicas y genotípicas; la estadística descriptiva correspondiente se muestra en la tabla 11. El locus que mayor variabilidad alélica mostró fue el correspondiente al gen *sca3*; fueron identificados 15 alelos *sca3* que variaron entre las 14 y 34 repeticiones de CAG, con una media y desviación estándar de 22.5 ± 4.87 unidades. Para los genes *sca1* y *sca6* fueron identificadas solamente nueve variantes alélicas. Los alelos salvajes para los genes *sca1*, *sca3*, *sca6*, *sca17* y *drpla* fueron los de 28 (22.0%), 23 (29.0%), 11 (31.0%), 37 (27.0%), y 14 (33.0%) unidades de CAG, respectivamente.

Tabla 11. Estadística descriptiva correspondiente a las variantes alélicas y genotípicas identificadas para los genes candidatos a modificadores de la edad de inicio en la SCA2.

Gen	Variantes alélicas											
	Alelos cortos				Alelos largos				Genotipos			
	No.	Rango	Media	D.E	No.	Rango	Media	D.E	No.	Rango	Media	D.E
<i>sca1</i>	8	24-32	28.2	1.67	7	27-33	29.6	1.65	13	52-64	57.8	3.07
<i>sca3</i>	9	14-27	19.9	4.47	13	14-34	25.0	3.82	21	28-57	44.9	6.97
<i>sca6</i>	7	5-13	10.2	2.09	7	7-17	11.9	1.96	14	12-28	22.1	3.68
<i>sca17</i>	9	23-37	34.3	2.41	7	33-39	36.5	1.23	10	56-75	70.8	3.23
<i>drpla</i>	9	7-19	11.4	2.88	9	7-19	14.5	2.05	7	14-38	25.9	4.22

Abreviaturas: No.- número de variantes alélicas o genotípicas identificadas; D.E- desviación estándar.

Se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al número de repeticiones de CAG entre los alelos cortos y largos en todos los loci analizados ($p < 0.001$). No se obtuvo correlación significativa entre la longitud de la secuencia de CAG en estos loci y los alelos *sca2* expandidos ($p > 0.05$), confirmando que las secuencias repetitivas de CAG en cada uno de estos loci representan eventos independientes. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos “prematureo” y “tardío” para los alelos *sca3* largos, el genotipo *sca3*, y los alelos *drpla* cortos (Tabla 12 y Figura 12-A-C).

Tabla 12. Análisis de las distribuciones alélicas y genotípicas en los grupos “prematureo” y “tardío” para el número de repeticiones de CAG en cinco loci genéticos.

Gen	Prueba U de Mann-Whitney para					
	Alelos cortos		Alelos largos		Genotipos	
	U	p	U	p	U	p
<i>sca1</i>	259.0	0.36	264.0	0.42	253.0	0.31
<i>sca3</i>	216.0	0.075	203.0	0.042	203.5	0.046
<i>sca6</i>	248.0	0.25	288.0	0.74	263.5	0.42
<i>sca17</i>	288.5	0.74	290.0	0.76	286.0	0.71
<i>drpla</i>	176.5	0.01	296.0	0.86	207.5	0.055

La diferencia encontrada entre los grupos “prematureo” y “tardío” para los alelos *drpla* cortos se sostuvo después de aplicar la corrección de Bonferroni para pruebas simultáneas ($p = 0.05$), no así para los alelos SCA3 largos ($p = 0.23$) o para el genotipo SCA3 ($p = 0.21$). En el grupo “prematureo” los alelos *drpla* cortos de hasta 12 unidades de CAG representaron el 41.4% de la

distribución, mientras que en el grupo “tardío” estos alelos representaron el 76.2% de la distribución (Figura 12-C). Por tanto, los alelos *drpla* de hasta 12 unidades repetitivas de CAG podrían considerarse protectivos, y aquellos con más de 12 unidades repetitivas de CAG podrían considerarse perjudiciales.

En esta muestra el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos explicó el 42.8% de la variabilidad observada en la edad de inicio de la enfermedad ($p < 0.0001$); los alelos *sca2* normales no tuvieron una contribución significativa ($p > 0.05$). La inclusión del número de repeticiones de CAG en los alelos *drpla* cortos mejoró el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.499$; $p < 0.0001$), de modo que el 7.1% de la varianza total de la edad de inicio puede ser atribuida al número de repeticiones de CAG en los alelos *drpla* cortos, mientras que el 12.4% de la varianza de la edad de inicio no explicada por el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, puede ser interpretada en términos de la variación del número de repeticiones de CAG en los alelos *drpla* cortos. A medida que aumentó el número de repeticiones de CAG en alelos *drpla* cortos, hubo una disminución de la edad de inicio.

De los individuos enfermos incluidos en esta muestra, solo a 16 se les pudo determinar la puntuación total de ataxia y a 13 la velocidad sacádica máxima. En este grupo, la puntuación total de ataxia no mostró correlación significativa con la edad de inicio ni con la edad del individuo o el tiempo de evolución ($p > 0.05$), pero sí con el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos ($r = 0.62$; $p = 0.01$). Ninguno de los genes candidatos a modificadores ni sus genotipos tuvo una influencia significativa sobre la puntuación total de ataxia una vez ajustada al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos ($p > 0.05$).

El número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos correlacionó con la puntuación total de ataxia/edad del individuo ($r = 0.86$; $p < 0.001$), pero no con la ajustada al tiempo de evolución ($p > 0.05$). Sólo los alelos *sca3* largos tuvieron una influencia significativa sobre el residual de la tasa de progresión de la enfermedad, expresada como la puntuación total de ataxia/edad, una vez ajustada al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos ($r = -$

0.512; $p=0.042$). La latencia sacádica ni la velocidad sacádica máxima tuvieron correlación significativa con el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos, ni con ninguno de los genes candidatos analizados o sus genotipos ($p>0.05$).

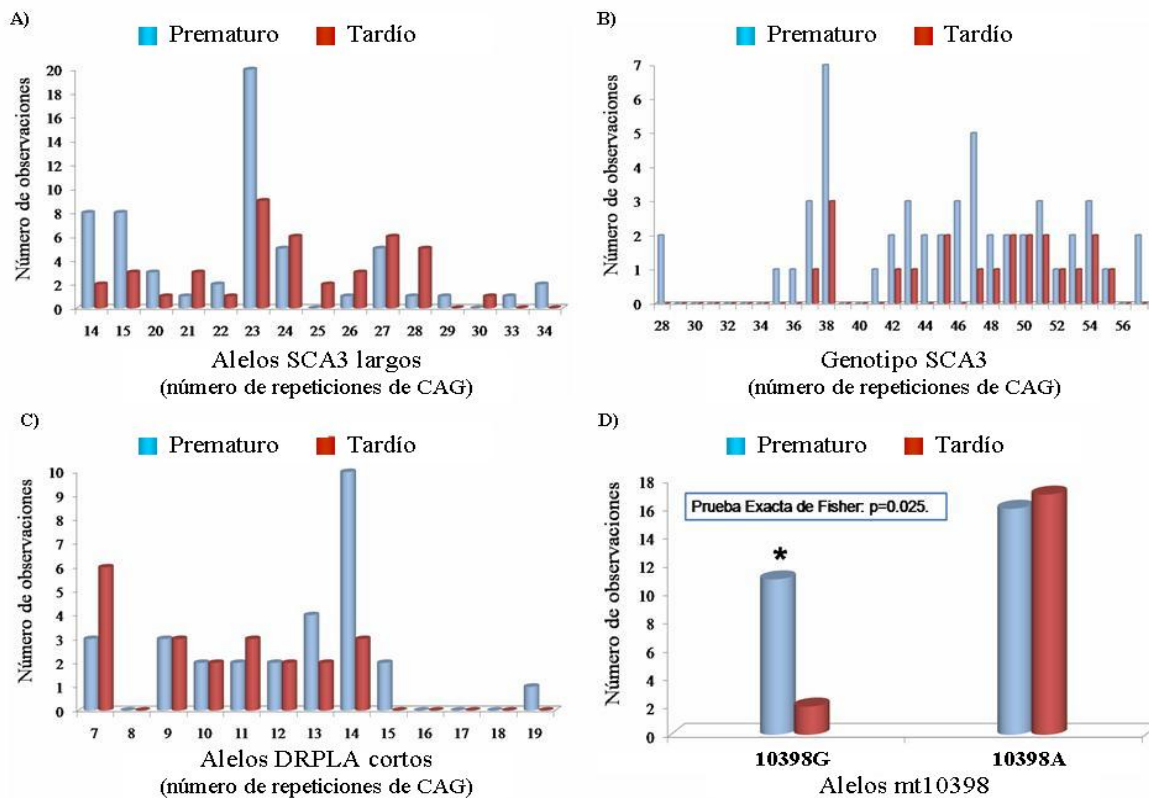


Figura 12. Distribución de frecuencias en los grupos “prematureo” y “tardío” para: A) Alelos *sca3* largos; B) Genotipo *sca3*; C) Alelos *drpla* cortos; D) Polimorfismo mt10398A/G del gen MTND3.

A partir del genotipaje del polimorfismo mitocondrial mt10398A/G, se obtuvo que el 40.7% (11/27) de los individuos genotipados pertenecientes al grupo de inicio prematuro presentaron la variante mt10398G; esta variante se encontró solamente en el 10.5% (2/19) de los individuos pertenecientes al grupo de inicio tardío. Se obtuvo que la variante mt10398G estuviera significativamente asociada a una edad de inicio temprana (Figura 12-D). El limitado número de individuos disponibles para este estudio impidió realizar análisis similares para polimorfismos mitocondriales menos comunes.

5. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

5.1 Variación del número de repeticiones de CAG del gen *sca2* en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Rangos de referencia

5.1.1 Umbral patológico y frecuencias génicas y genotípicas para el gen *sca2*

Para las enfermedades poliglutamínicas se han definido rangos de referencia de acuerdo al número de repeticiones de CAG en los genes causales (Anexo 2). La primera distinción necesaria -rango normal *versus* patológico- parte de la definición del “umbral patológico”, entendido como el número de repeticiones de CAG mínimo necesario para provocar la manifestación de la enfermedad. En el caso particular de la SCA2, los resultados alcanzados dan fundamento a los hallazgos de Santos *et al.* (12) y de Fernández *et al.* (167), quienes encontraron individuos que enfermaron siendo portadores de alelos con 32 o 33 repeticiones de CAG, definiendo el rango de los alelos patológicos como aquellos con más de 31 unidades de CAG.

Aquí confirmamos que para el gen *sca2*, 32 es el número de repeticiones de CAG mínimo necesario para provocar la manifestación clínica de la enfermedad. Este hecho se fundamenta en la identificación de sujetos con 30 o 31 unidades de CAG clínicamente asintomáticos aun cuando han alcanzado edades avanzadas, y de un individuo previamente reportado (12), que siendo portador de un alelo con 32 repeticiones de CAG enfermó a los 45 años de edad. Este último es un caso excepcional, por cuanto se han encontrado otros sujetos portadores de alelos *sca2* con 32-33 unidades de CAG en otras poblaciones del mundo y ninguno había enfermado al momento del estudio (17, 18, 238).

Dado que el umbral patológico definido para las enfermedades poliglutamínicas depende del número total de individuos estudiados, tanto sanos como enfermos, lo que a su vez depende de la frecuencia de aparición de estas enfermedades, cabría esperar la aparición de enfermos con SCA2 portadores de alelos de menos de 32 unidades de CAG. Evidencias experimentales obtenidas a

partir de modelos transgénicos en *Caenorhabditis elegans*, sugieren que el umbral patológico en las enfermedades poliglutamínicas está vinculado al proceso de agregación de proteínas poliglutamínicas expandidas y que es dinámico, dependiendo esencialmente del tiempo biológico de la especie, del contexto proteico del dominio poliglutamínico, del ambiente celular interno y externo, y de la longitud de la secuencia poliglutamínica (239).

Las frecuencias génicas obtenidas a partir del análisis de los datos se corresponden con las de otras poblaciones del mundo con SCA2 (3, 171, 240), si bien en la población cubana la variabilidad alélica es mayor (13-79 CAGs). En comparación, por ejemplo, para la India se ha reportado una serie alélica conformada por alelos *sca2* cuyas secuencias repetitivas de CAG varían entre las 18 y 48 unidades (166), para Francia y Alemania varían entre las 15 y 58 unidades (196), mientras que para Japón varían entre las 15 y 59 unidades (40). En todos los casos el alelo salvaje correspondió al de 22 repeticiones de CAG.

Tanto la identificación del único caso del mundo que haya enfermado siendo portador de un alelo *sca2* con 32 repeticiones de CAG, como el haber encontrado en la población cubana afectada la mayor variabilidad alélica para la secuencia repetitiva de CAG del gen *sca2* en el mundo, demuestran el extraordinario valor de esta población para la realización de estudios genéticos sobre una enfermedad con efecto umbral o variación cuasi-continua.

5.1.2 Penetrancia de alelos *sca2* expandidos

Las valoraciones acerca de la penetrancia de alelos *sca2* expandidos han ido cambiando en el transcurso del tiempo, y se espera que esta tendencia continúe dado su carácter intrínsecamente relativo. Inicialmente se asumió que la SCA2 tenía una penetrancia del 100% (39, 126). Luego se sugirió la existencia de penetrancia incompleta en el rango de 32 a 35 repeticiones de CAG (13, 241). Sin embargo, no se han realizado estudios sistemáticos en muestras representativas de pacientes con SCA2 para comprobarlo.

Considerando que el inicio de la SCA2 a edades superiores a los 75 años para los hombres y después de los 79.3 años para las mujeres, está por encima de la esperanza de vida en Cuba

(242), el análisis realizado indicó que los alelos *sca2* con más de 36 repeticiones de CAG tienen una penetrancia completa, y que hay una penetrancia reducida en el rango de 32 a 36 repeticiones de CAG. Existe una clara tendencia a que la penetrancia aumente a medida que sea mayor el número de repeticiones de CAG: 50% para 32 repeticiones de CAG, ~86% para 34, ~97% para 36 repeticiones de CAG, y 100% para ≥ 37 repeticiones de CAG. La misma tendencia se ha observado en la enfermedad de Huntington, donde la penetrancia del gen *IT15* fue del 33.3% para alelos con 36 repeticiones de CAG, del 88.9% para alelos con 39 CAGs, y del 99% para alelos con 41 unidades de CAG; los alelos con más de 41 repeticiones de CAG mostraron una penetrancia completa (51).

Además de la influencia del número de repeticiones de CAG, la penetrancia reducida observada en el rango de 32 a 36 unidades de CAG podría deberse a la influencia de factores modificadores existentes en el trasfondo genético del individuo, o a factores externos como la exposición a sustancias genotóxicas, o una dieta o estilos de vida inapropiados. Los estimados de penetrancia podrían también variar entre poblaciones con SCA2 en dependencia de la esperanza de vida de poblaciones particulares para determinados periodos.

5.1.3 Inestabilidad intergeneracional de alelos normales largos. Mutaciones *de novo*

A partir del análisis de la transmisión intergeneracional de alelos *sca2* con 25 a 31 repeticiones de CAG, obtuvimos que la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG fue de ~38%. Este resultado es muy similar a lo reportado para una población venezolana con la enfermedad de Huntington (50). Significativamente, se encontró en una generación de una de las familias (F1) estudiadas un caso portador de un alelo con 32 repeticiones de CAG, posiblemente resultante de la expansión intergeneracional de un alelo normal largo materno con 30 o 31 repeticiones de CAG. Otro caso de esta familia portador de un alelo con 31 repeticiones de CAG, tuvo dos hijas con 32 y 33 repeticiones de CAG respectivamente, demostrando la tendencia a la expansión de la secuencia repetitiva de CAG en esta familia, y la ocurrencia de al menos dos mutaciones *de novo*. Todos los individuos portadores de alelos con 32 o 33 repeticiones de CAG

estudiados en la familia F1 son clínicamente sanos, incluso habiendo alcanzado uno de los casos la avanzada edad de 65 años, aunque no puede descartarse la posibilidad de que pudieran enfermar en el futuro.

Al parecer, este tipo de mutaciones es inusual en la SCA2, a diferencia de la SCA7 o la enfermedad de Huntington donde la ocurrencia de mutaciones *de novo* es relativamente frecuente (244, 245). Significativamente, en ninguna de las transmisiones estudiadas en la familia F117 hubo inestabilidad de un alelo normal largo de 30 repeticiones de CAG. La estabilidad/inestabilidad mostrada por alelos con 25 o más repeticiones de CAG en estas familias pudiera deberse a la presencia/pérdida de una o varias de las interrupciones de CAA características de las secuencias repetitivas de CAG en alelos *sca2* normales (39). Se ha demostrado que las interrupciones de CAA conceden estabilidad a la secuencia repetitiva de CAG y su ausencia predispone a los alelos a la inestabilidad y a la expansión patológica (166, 168).

A partir de lo analizado, proponemos como rango de alelos intermedios para la SCA2 aquel constituido por alelos con 25 a 31 repeticiones de CAG. No obstante, sería necesario replicar el estudio en un mayor número de casos, así como tomar en consideración la configuración de la secuencia repetitiva de CAG para evaluar la significación de las interrupciones de CAA sobre la probabilidad de ocurrencia de mutaciones *de novo*.

Se ha sugerido que los alelos intermedios en las enfermedades poliglutamínicas representan un reservorio natural para la generación de alelos expandidos y el surgimiento de nuevas familias afectadas (14, 168, 246, 247). Esta suposición podría ayudar a explicar la persistencia de la SCA2 en Cuba a pesar de la gran anticipación genética que le es característica. Aunque los resultados obtenidos dan sustento parcial a tal hipótesis, su verificación en Cuba exigiría la realización de estudios sobre la frecuencia de estos alelos en la población general, así como el establecimiento de una asociación positiva entre sus frecuencias y las prevalencias de la SCA2 en el territorio nacional.

5.1.4 Inestabilidad intergeneracional de los alelos *sca2* expandidos

El análisis realizado reveló una frecuencia global de inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos (~76%), que coincide con la frecuencia de inestabilidad (37-89%) en otras poblaciones del mundo (17, 18, 171). De modo similar a otras poblaciones con SCA2, en las familias cubanas se evidenció una tendencia a la ocurrencia de expansiones, que tienen lugar con una frecuencia casi cinco veces superior a las contracciones, si bien no muestran diferencias significativas en cuanto a su magnitud. De modo consistente con observaciones previas, en las familias estudiadas hubo un marcado “efecto parental”, manifestado por la significativamente mayor magnitud de las expansiones ocurridas en transmisiones paternas en comparación con las ocurridas en transmisiones maternas de alelos *sca2* expandidos (171, 229, 248), aunque no existieron diferencias en la proporción de expansiones *versus* contracciones.

El efecto del sexo del progenitor transmisor de la mutación sobre la inestabilidad de la secuencia repetitiva de CAG podría deberse a actividades especializadas del metabolismo del ADN, vinculadas a factores implicados en los procesos de replicación, reparación o recombinación, a programas de replicación, perfiles de expresión y modificaciones epigenéticas (26). La inestabilidad observada en las transmisiones paternas pudiera resultar de mutaciones pre-meióticas durante los ciclos mitóticos de la espermatogénesis, como fuera sugerido para la enfermedad de Huntington (249).

A diferencia de la espermatogénesis, la ovogénesis inicia *in utero*, se detiene durante años en el diploteno de la profase I (desde el nacimiento hasta la pubertad), termina solo minutos antes de la ovulación, y no está completa hasta después de la fertilización. También en contraste con las células germinales masculinas post-meióticas virtualmente carentes de proteínas, los ovocitos en reposo son prolíficos en actividades de reparación y recombinación de ADN que influyen sobre la longitud de la secuencia repetitiva de CAG en alelos expandidos (53).

La longitud de la secuencia repetitiva de CAG en alelos expandidos es otro de los factores señalados como influyentes sobre la inestabilidad intergeneracional de alelos expandidos en las

enfermedades poliglutamínicas. Sin embargo, las evidencias obtenidas a partir de estudios en humanos resultan contradictorias (52, 58). En el caso de la SCA2 no existían pruebas que apoyaran una posible relación entre la longitud de la secuencia repetitiva de CAG y su inestabilidad intergeneracional (171). Sin embargo, se reveló que en familias cubanas con SCA2 la inestabilidad intergeneracional está influida por el número de repeticiones de CAG de los alelos *sca2* transmitidos por vía paterna. Este hallazgo da fundamento a la hipótesis de que la inestabilidad es promovida por la propia secuencia repetitiva de CAG, como resultado de su propensión, dependiente de su longitud, a formar estructuras secundarias no convencionales (26). La edad conceptiva del progenitor transmisor de la mutación también ha sido apuntada como factor que influye sobre la inestabilidad intergeneracional de secuencias repetitivas de CAG (250). Para la SCA2 existen evidencias parciales de la influencia de la edad conceptiva sobre la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG en alelos *sca2* expandidos (18). En el presente estudio se reveló que la edad conceptiva en su interacción con la vía de transmisión de la mutación tuvo una influencia significativa sobre la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG, donde la magnitud de la inestabilidad tiende a aumentar con el avance de la edad en transmisiones paternas, y a disminuir en transmisiones maternas. Resultados similares han sido obtenidos en modelos transgénicos de enfermedades causadas por mutaciones dinámicas, y sugieren una continuidad de la inestabilidad en la línea germinal masculina post-pubertad, probablemente debida a errores en los procesos de replicación o reparación durante las etapas proliferativas pre-meióticas de las divisiones de las espermatogonias (251-253).

Alternativamente, podría existir una viabilidad reducida de ovocitos portadores de mutaciones de cierta envergadura. Se ha sugerido que en aquellas enfermedades poliglutamínicas en que la proteína sea expresada en los ovocitos, como es el caso de la enfermedad de Huntington y la SCA2, los ovocitos primarios pudieran sufrir una muerte celular progresiva durante el período de reposo, y aquellos con las secuencias de CAG más expandidas serían eliminados primero,

provocando un enriquecimiento relativo de ovocitos con expansiones cortas. De aquí se deriva el que las mujeres que conciban a edades más tardías, deberían transmitir alelos con expansiones más pequeñas (254). Para probar este supuesto se realizó un análisis de correlación entre la edad conceptiva y la longitud de los alelos expandidos transmitidos a la descendencia, de lo que se obtuvo una correlación inversa y altamente significativa en las transmisiones maternas, no así en las paternas. Este resultado constituye una evidencia de que la hipótesis anteriormente señalada podría ser cierta también para la SCA2.

A diferencia de lo reportado para la enfermedad de Huntington (56, 255), no se encontró que el sexo del descendiente tuviera alguna influencia significativa sobre la inestabilidad intergeneracional en la SCA2. Por tanto, el análisis realizado no confirma la posible existencia de un componente post-cigótico sexo específico para la inestabilidad intergeneracional de la secuencia repetitiva de CAG en alelos *sca2* expandidos.

De modo similar a lo reportado para la enfermedad de Huntington (56, 256), los resultados obtenidos demuestran que factores genéticos *cis*- y *trans*-actuantes, adicionales al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos transmitidos, están involucrados en la inestabilidad intergeneracional de dichos alelos. La caracterización de tales factores no sólo ofrecerá mejores posibilidades para el asesoramiento genético de individuos en riesgo, sino que también esclarecerá los mecanismos que subyacen a las mutaciones *de novo*. La comprensión de las rutas responsables de la inestabilidad de la secuencia repetitiva de CAG del gen *sca2*, podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas orientadas a prevenir la expansión de la secuencia repetitiva, o a inducir su contracción. De hecho, se ha demostrado la influencia del producto de los genes *Msh2*, *Msh3* y *Pms2*, involucrados en rutas de reparación de ADN, y de factores tales como la pureza del segmento repetitivo, nucleosomas y la metilación de islotes de CpG, sobre la inestabilidad de secuencias repetitivas de CAG; también se han identificado modificadores de la dinámica de la inestabilidad de secuencias repetitivas de CAG, con potencialidades terapéuticas (59).

5.2 Edad de inicio y riesgo bayesiano dependiente de la edad para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 es considerada como una enfermedad de inicio tardío, aunque la edad en que aparecen los síntomas es muy variable inter- e intrafamiliarmente (21, 126). La edad de inicio sigue una distribución aproximadamente normal, donde la mayoría de los individuos manifiesta la enfermedad entre la tercera y cuarta décadas de la vida; un comportamiento similar se ha reportado para la enfermedad de Huntington (257) y para la SCA3 (258).

No obstante, en la cohorte analizada se reveló que los individuos que manifiestan la SCA2 antes de los 25 años de edad representan el 31% del total; se encontró una frecuencia del 2% para casos mayores de 60 años. Por el contrario, para la enfermedad de Huntington se ha reportado una frecuencia de casos juveniles del 10%, lo mismo para casos que enfermaron después de los 60 años (259). También para la SCA3 se ha descrito la rara ocurrencia de casos juveniles o de comienzo tardío (258). Como fuera reportado para la SCA3 (260) y también para la SCA2 (128), no se encontró que el sexo tuviera una influencia significativa sobre la edad de inicio de la enfermedad.

Como en cualquier otra enfermedad con un patrón de herencia autosómico dominante, en la SCA2 existe un riesgo *a priori* del 50% de que el individuo afectado transmita la enfermedad a cada uno de sus hijos, y un riesgo *a priori* del 25% de que un hijo de un individuo afectado transmita la enfermedad a cada uno de sus descendientes. Sin embargo, el riesgo de haber heredado la mutación patológica disminuye con el avance de la edad del individuo. Esto también ocurre en la enfermedad de Huntington y en la SCA3, pero en estos casos la disminución del riesgo es demasiado lenta como para obtener valores suficientemente bajos durante la etapa reproductiva de la vida. Cada descendiente directo de un individuo con la enfermedad de Huntington, tiene un riesgo del 48% a los 30 años de edad, del 43% a los 40 años, y del 32% a los 50 años de edad (15). Los estimados correspondientes a la SCA3 son del 41%, 29% y 14% a

edades de 30, 40 y 50 años respectivamente (260). Por el contrario, en la SCA2 la disminución del riesgo es más rápida. De acuerdo a los estimados obtenidos, cada descendiente directo de un individuo enfermo tiene riesgos del 33%, 21% y 10% a edades de 30, 40 y 50 años respectivamente.

Es necesario apuntar que la edad de inicio de la enfermedad -tomada para el cálculo del riesgo bayesiano- puede variar significativamente entre distintas poblaciones, dependiendo de la influencia diferencial de factores genéticos, ambientales y estocásticos. Si bien los estimados se obtuvieron a partir de una cohorte numerosa de enfermos con SCA2, diferencias inter-poblacionales en la distribución de factores pertenecientes a las categorías señaladas, podrían tener un impacto significativo sobre el riesgo estimado.

Por otra parte, tanto la frecuente aparición de casos juveniles como la rápida disminución del riesgo genético en la SCA2, favorecen la hipótesis de que las secuencias que flanquean la secuencia poliglutamínica en la ataxina-2, protegen menos contra la ganancia de función producida por la expansión de la secuencia poliglutamínica, en comparación con otras proteínas implicadas en enfermedades poliglutamínicas (261-262).

5.3 Factores genéticos y fisiológicos modificadores del fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

5.3.1 Fenotipo clínico y número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos

5.3.1.1 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre la edad de inicio de la enfermedad

Utilizando una cohorte numerosa uniformemente evaluada y analizada, este estudio demostró que el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos es el principal determinante de la edad de inicio en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. En la muestra analizada, este factor genético explicó el 61% de la variabilidad observada en la edad de inicio, lo que está en correspondencia con lo reportado para otras poblaciones con SCA2 en el mundo (49-73%) (17, 18, 192, 196).

Se demostró que la relación entre la edad de inicio y el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos es mejor explicada por un modelo de regresión bi-segmentado, de modo similar a lo reportado para la enfermedad de Huntington (263). Los resultados alcanzados muestran que la relación entre estas variables difiere para distinto número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos. Cuando estos alelos tienen más de 45 repeticiones de CAG, la adición de una nueva unidad de CAG tiene una influencia menor sobre la edad de inicio, en comparación con lo que ocurre para alelos con menos de 45 unidades de CAG. Esta transición podría deberse a la probable diferencia en los mecanismos patológicos de las ataxinas-2 en cada rango, y pudiera tener una expresión clínica diferencial que diera lugar a las formas de inicio juvenil y de inicio en la adultez para la SCA2. De hecho, la forma juvenil de SCA2 es más severa que la forma de inicio en la adultez, con la presencia de retinopatía pigmentaria y temblores rara vez vistos en la forma de inicio en la adultez (163, 164, 264).

Aunque tanto la forma de inicio juvenil como la de inicio en la adultez son causadas por la expansión de la secuencia repetitiva de CAG en el gen *sca2*, podría ocurrir que diferentes mecanismos patológicos estuvieran implicados en cada forma. Estos mecanismos difieren lo suficiente como para provocar distintos fenotipos clínicos, así como para producir dos pendientes de regresión diferentes en la curva de la edad de inicio. Hipotéticamente, la adición de una nueva unidad de CAG a alelos en el rango de 32 a 45 repeticiones, podría provocar disfunción en el contexto proteico, mientras que la adición de una nueva unidad de CAG a alelos con más de 45 repeticiones de CAG podría incrementar la toxicidad del dominio poliglutamínico independientemente del contexto proteico.

También la enfermedad de Huntington, la Atrofia Dentatorubral-Pálidoluisiana y la SCA17, muestran diferenciación entre las formas de inicio juvenil y de inicio en la adultez (263), lo que podría significar la universalidad de una relación bi-segmentada entre la edad de inicio y la longitud de los alelos expandidos para las enfermedades poliglutamínicas.

5.3.1.1.1 Probabilidad de enfermar a una edad determinada para un número de repeticiones de CAG específico en alelos *sca2* expandidos

Dado que el rango de edades de inicio para un número de repeticiones de CAG particular en el gen *sca2* es amplio, se ha recomendado no utilizar esta variable genética en solitario para predecir la edad de inicio de un individuo en particular (21). Sin embargo, todos los estudios que exploran la relación entre la edad de inicio y el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos, se basan en análisis de correlación o regresión donde solo toman en consideración a individuos enfermos. La inclusión de individuos presintomáticos junto a enfermos, permitió obtener curvas de supervivencia para predecir la probabilidad de que un individuo manifieste la SCA2 a una edad determinada. Estas curvas están basadas en individuos con expansiones de 34 a 45 unidades de CAG, lo que representa el 93.8% de las personas con expansiones de más de 31 unidades de CAG incluidas en el conjunto de datos analizado.

Las curvas de supervivencia fueron significativamente diferentes para cada número de repeticiones de CAG estudiado, lo que da mayor fundamento a la importancia del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos como el factor predominante en la determinación de la edad de inicio. Aunque estas curvas no deben ser utilizadas para predecir la edad de inicio particular para un individuo, este análisis puede tener utilidad clínica ofreciendo estimados de supervivencia libre de síntomas a un individuo que solicite información adicional en un programa de diagnóstico predictivo. Estos resultados también tienen implicaciones significativas para el diseño de ensayos clínicos en busca de opciones terapéuticas.

El propósito de nuevas terapias para la SCA2 está dirigido a enlentecer o detener el progreso de la enfermedad, o a retardar su aparición en sujetos presintomáticos. Un diseño apropiado de ensayos clínicos para personas en riesgo deberá tomar en consideración la edad de inicio esperada para cada individuo en particular. Por ejemplo, se espera que el 96% de las personas con 40 repeticiones de CAG haya manifestado síntomas de SCA2 a los 50 años de edad, con una edad de inicio mediana de 34 años (Anexo 5). La extensión de la edad de inicio por encima de su

valor estimado podría indicar un efecto beneficioso de una terapéutica en particular. Esta información indica que la disponibilidad de suficientes personas con un número de repeticiones de CAG específico, es vital para una más rápida evaluación del efecto esperado en el marco de un ensayo clínico.

Adicionalmente, el análisis realizado produjo estimados más desfavorables en comparación con los reportados para la enfermedad de Huntington. Por ejemplo, la edad de inicio mediana estimada para 43 repeticiones de CAG en la SCA2 es de 20 años, mientras que en la enfermedad de Huntington es de 44 años (51). Estas observaciones refuerzan la hipótesis que plantea que las secuencias flanqueantes en la ataxina-2, protegen poco contra la ganancia de función producida por la expansión de la secuencia poliglutamínica (261).

5.3.1.2 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre la duración de la vida y duración de la enfermedad

El número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos influyó significativamente sobre la duración de la vida y la duración de la enfermedad. Estos resultados se corresponden con otros previamente reportados para la SCA3 (265).

Resulta interesante el que la duración de la vida muestre menos variación que la edad de inicio de la enfermedad con respecto al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos, a pesar del comparativamente menor número de casos estudiados. Probablemente, parte de la variabilidad observada en la edad de inicio refleje diferencias de introspección y auto-observación entre los individuos enfermos. En consecuencia, la duración de la vida sería un marcador clínico comparativamente más objetivo que equivaldría al tiempo de exposición de las neuronas al efecto neurotóxico de la ataxina-2 expandida.

5.3.1.3 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre la puntuación total de ataxia

Se pudo comprobar que el factor que más influye sobre la puntuación total de ataxia es el tiempo de evolución de la enfermedad y que el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2*

expandidos también tiene un efecto significativo sobre la misma. Este resultado expande lo previamente reportado para una muestra más pequeña de individuos cubanos con SCA2 (147). Por otra parte, Rakowicz *et al.* (266) encontraron una correlación significativa entre el número de repeticiones de CAG en alelos expandidos y la puntuación total de ataxia en un pequeño grupo de individuos polacos con SCA2 o SCA1. Además, en individuos con SCA3 fue encontrado que el tiempo de evolución de la enfermedad correlacionó significativamente con la puntuación total de ataxia (267). Estas observaciones dan fundamento a la naturaleza progresiva de las ataxias espinocerebelosas, y al papel relevante de la mutación patológica en la determinación de la severidad clínica en estas enfermedades.

5.3.1.4 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre la velocidad sacádica máxima y la latencia sacádica

El enlentecimiento de los movimientos sacádicos horizontales representa un endofenotipo objetivo, característico y casi exclusivo de enfermedades poliglutamínicas (268, 269). En la SCA2, el enlentecimiento de los movimientos sacádicos es pronunciado y aparece desde las primeras etapas de la expresión clínica de la enfermedad (133). En la muestra analizada, el número de repeticiones de CAG en alelos SCA2 expandidos tuvo una fuerte y significativa influencia sobre la velocidad sacádica máxima (VSM). Comparado con la edad de inicio, se espera que la VSM tenga mayor confiabilidad y que sea menos dependiente de factores ambientales. Por tanto, la VSM parece ser un marcador endofenotípico de utilidad para la identificación de factores genéticos moduladores de la toxicidad de la ataxina-2 expandida (147). La prolongación de la latencia sacádica es frecuente en enfermos con SCA2, y es expresión de una lesión de tipo axonomielínico (147). Aquí se partió de la hipótesis de que alelos *sca2* con mayor número de repeticiones de CAG estarían asociados a latencias sacádicas más prolongadas. Los resultados obtenidos indican que este supuesto científico no es acertado.

5.3.1.5 Efecto del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos sobre la tasa de progresión de la enfermedad

De modo similar a lo reportado para la enfermedad de Huntington, Atrofia Muscular Espinobulbar, SCA1, SCA3, e incluso en un reducido número de individuos de la India con SCA2 (192), se reveló en una extensa muestra de individuos cubanos con SCA2, que la tasa de progresión de la enfermedad depende fuertemente del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos. Un mayor número de unidades de CAG en estos alelos implica una más rápida progresión de la enfermedad.

La fuerte correlación de este factor genético con la puntuación total de ataxia ajustada a la edad, en contraposición con su débil correlación con la puntuación total de ataxia ajustada al tiempo de evolución, contribuye a validar la hipótesis de que el proceso patológico probablemente inicie mucho antes de la manifestación clínica de la enfermedad (270). Una teoría alternativa sobre la progresión del proceso neurodegenerativo en enfermedades poliglutámicas plantea que podría existir una larga fase de latencia en la que no exista disfunción neuronal con expresión clínica, a la cual siga una fase de giro rápido hacia el estado clínico disfuncional (270).

El que la enfermedad tuviera una progresión similar entre hombres y mujeres para la puntuación total de ataxia ajustada a la edad del individuo y que, sin embargo, la progresión fuera significativamente menor en hombres que en mujeres para la puntuación total de ataxia ajustada al tiempo de evolución de la enfermedad, sugiere la existencia de factores sexo específicos con una fuerte influencia sobre la progresión de la enfermedad, que cobra significación a partir del comienzo de la enfermedad.

Aunque la puntuación total de ataxia no es una medida estrictamente lineal de severidad de la enfermedad, constituye hasta la fecha la escala más objetiva para evaluar pacientes con ataxia. Además, como no determinamos la puntuación total de ataxia longitudinalmente, la tasa de progresión de la enfermedad medida en este estudio solo refleja la progresión de la enfermedad al momento del examen.

5.3.2 Efectos del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales y del genotipo *sca2* sobre el fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

En la presente investigación se reveló que el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales tiene una influencia significativa sobre la edad de inicio de la enfermedad. Ninguno de los estudios realizados en otras poblaciones del mundo con SCA2 pudo demostrar la existencia de una contribución significativa de este factor sobre la edad de inicio (17, 19, 195, 196), probablemente debido a las comparativamente pequeñas muestras analizadas o a diferencias en la metodología para la determinación del número de repeticiones de CAG, o en la frecuencia de las distintas variantes alélicas. Adicionalmente, estos estudios fueron llevados a cabo en familias con SCA2 de diferente origen geográfico, lo que difiere de la presente investigación, realizada en una extensa y genéticamente homogénea población de individuos con SCA2 (127). Por tanto, es posible que las diferencias encontradas en cuanto al efecto del número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales se deban a la ocurrencia de una “impronta genómica” diferencialmente distribuida en poblaciones con diverso origen étnico. Efectos similares de los alelos normales sobre la edad de inicio se han reportado para la SCA3 (271), SCA1 y SCA6 (196).

Ningún estudio previo había demostrado la existencia de un efecto significativo de los alelos *sca2* normales sobre la progresión de la enfermedad. La influencia significativa encontrada de los alelos *sca2* normales sobre la puntuación total de ataxia/tiempo de evolución, y no sobre la puntuación total de ataxia/edad del individuo, unido al hecho de que a medida que aumentó el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales disminuyó la tasa de progresión de la enfermedad, sugiere que la ataxina-2 nativa tiene un efecto neuroprotector que cobra mayor significación después del comienzo de la enfermedad.

Los resultados obtenidos sugieren que una interacción entre la ataxina-2 nativa y su forma expandida podría conducir al alivio del síndrome clínico. De hecho, se ha demostrado que esta proteína es reclutada en los agregados proteicos generados por la ataxina-2 expandida (208), y se han propuesto roles neuroprotectores para la ataxina-2 nativa vinculados a la regulación de la apoptosis (220, 222).

También para la huntingtina nativa se han demostrado roles neuroprotectores, esta vez ligados a la regulación de la producción de factor de crecimiento derivado del cerebro (*BDNF*, por sus siglas en inglés), y de un efecto inhibitorio sobre la caspasa-3 (75, 272). Coincidentemente, se ha reportado un efecto de los alelos HD normales sobre la edad de inicio de la enfermedad de Huntington (273, 274), similar al encontrado aquí para la SCA2.

Alternativamente, por ejemplo, los resultados obtenidos son consistentes con la posible existencia de un modificador genético en desequilibrio de ligamiento con los alelos *sca2* normales. El esclarecimiento de esta cuestión requerirá de futuros esfuerzos investigativos.

Por otra parte, resulta significativo que no se evidenciara ninguna asociación significativa entre el genotipo *sca2* y el fenotipo clínico de la enfermedad. El genotipo *sca2* expresado como la sumatoria del número de repeticiones de CAG en alelos normales y expandidos, teóricamente equivale a la “carga poliglutamínica” para el locus *sca2* a que está sometida la célula (21). Se espera que una mayor carga poliglutamínica se traduzca en una mayor gravedad del fenotipo clínico, por cuanto habría una mayor tendencia al secuestro de monómeros de la ataxina-2 nativa en los agregados intracelulares formados por la ataxina-2 expandida, y un mayor estrés energético celular ligado a la síntesis de proteínas con secuencias poliglutamínicas más extensas. El secuestro de monómeros de ataxina-2 nativa en los agregados formados por la ataxina-2 expandida, podría contribuir a la gravedad del fenotipo clínico a través de un efecto negativo dominante, que exacerbaría la probable pérdida de función asociada a la expansión del dominio poliglutamínico en la ataxina-2 mutante; al menos para la huntingtina y la atrofina-1 se ha demostrado que la expansión de la secuencia poliglutamínica también implica una pérdida de función (66, 67).

Alternativamente, podría proponerse que el no haber encontrado asociación entre el genotipo *sca2* expresado como la sumatoria del número de repeticiones de CAG en alelos normales y expandidos y el fenotipo clínico de la enfermedad, podría deberse a un artefacto matemático inherente a la forma en que fuera operacionalizada la variable predictora. En el caso particular

del presente estudio, fue demostrado que los alelos *sca2* expandidos y normales tienen efectos opuestos sobre marcadores del fenotipo clínico, por lo que la sumatoria del número de repeticiones de CAG en alelos normales y expandidos, es más cercana a un “efecto neto” que a una “carga poliglutamínica” para el locus SCA2. No obstante, el genotipo *sca2* operacionalizado como variable cualitativa, tampoco tuvo influencia significativa sobre el fenotipo clínico de la enfermedad.

5.3.3 Efecto de la dosis genética sobre el fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

En la presente investigación se logra, por primera vez en el mundo, establecer una comparación entre enfermos homocigóticos y heterocigóticos para alelos *sca2* expandidos con igual número de repeticiones de CAG, y la serie más numerosa de enfermos homocigóticos hasta la fecha. El análisis realizado sugiere la existencia de diferencias clínicas significativas aunque sutiles, entre ambos grupos. En primer lugar, dos de los homocigóticos estudiados (50%) manifestaron la enfermedad más tempranamente que lo esperado para individuos heterocigóticos. Estos dos casos tuvieron los alelos *sca2* expandidos más largos entre los homocigóticos estudiados, lo que sugiere que el efecto de la dosis sobre la edad de inicio está condicionado al número de repeticiones de CAG en estos alelos. No obstante, uno de estos homocigóticos tuvo alelos en el rango de baja penetrancia (35/35), lo que sugiere que la homocigosidad puede influir significativamente sobre la edad de inicio incluso cuando se trate de alelos *sca2* expandidos en el rango patológico bajo.

En segundo lugar, el homocigótico que pudo ser comparado con heterocigóticos en cuanto a la duración de la vida (caso 4; genotipo 33/41), vivió menos tiempo que lo esperado. Esto sugiere que la doble dosis genética para alelos *sca2* expandidos compromete la esperanza de vida de los individuos afectados. Este homocigótico no se diferenció de los heterocigóticos en cuanto a la duración de la enfermedad, lo que sugiere que, al menos en este caso, la dosis genética no influyó sobre la progresión de la enfermedad.

En tercer lugar, el caso con genotipo 35/35 tuvo una mayor severidad del fenotipo clínico, evaluada en términos de la puntuación total de ataxia, la velocidad sacádica máxima y la latencia sacádica, que los heterocigóticos. El homocigótico con genotipo 33/41 tuvo una latencia sacádica que no se distinguió de la esperada para los heterocigóticos, y una velocidad sacádica máxima incluso mayor que la esperada. En cuarto lugar, el caso con genotipo 35/35 tuvo una tasa de progresión de la enfermedad, evaluada en términos de la puntuación total de ataxia/edad, mayor que la esperada. Estas observaciones, tomadas en su conjunto, sugieren la existencia de un efecto de dosis genética operando en la SCA2, donde la homocigosis para alelos expandidos implica una mayor severidad del fenotipo clínico, así como la existencia de factores genéticos, fisiológicos y del ambiente externo adicionales, con influencia significativa sobre el fenotipo clínico, y una expresión fenotípica diferencial de la dosis genética.

Efectos similares de la dosis genética sobre el fenotipo clínico para la SCA2 se han informado en enfermos de la India e Italia (197-199), con distinto trasfondo genético que los casos cubanos, lo que enfatiza el rol principal de los alelos expandidos en la determinación del fenotipo clínico. También se ha encontrado un efecto de dosis genética sobre el fenotipo en modelos animales transgénicos para la SCA2 (63, 64).

La mayor severidad del fenotipo clínico en individuos homocigóticos para alelos *sca2* expandidos puede ser consecuencia de un mayor efecto neurotóxico debido a la duplicación de la concentración intracelular de ataxina-2 expandida, lo que aceleraría el proceso de nucleación y elongación de los agregados poliglutamínicos intra- o perinucleares (186, 275) asociados al proceso patológico. Alternativamente, la ataxina-2 expandida podría no solo actuar a través de la ganancia de una función tóxica, sino que podría perder una función neuroprotectora hipotética de la ataxina-2 nativa. En este caso, la homocigosis para alelos *sca2* expandidos semejaría una pérdida “recesiva” de la función de la ataxina-2 nativa.

Los reportes existentes acerca del efecto de la homocigocidad sobre el fenotipo clínico en otras enfermedades poliglutamínicas apoyan, en su mayoría, la concepción de un efecto de dosis

operando en este grupo de enfermedades (200, 276). Estos resultados proponen que las enfermedades poliglutamínicas en general, y la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 en particular, son afecciones genéticas humanas con dominancia intermedia o incompleta, donde el fenotipo clínico de individuos homocigóticos es más grave que el de los heterocigóticos.

Como la SCA2 es poco frecuente si se compara con las llamadas enfermedades comunes (p. ej. Enfermedad de Alzheimer o la hipercolesterolemia familiar), un estudio como el aquí presentado tiene que realizarse retrospectivamente. Esto implica que se depende de la información clínica disponible obtenida en el curso del tiempo por diferentes especialistas. Aunque la combinación de estos factores implica que no se puede ser categórico en la interpretación, el análisis realizado sugiere que los casos homocigóticos para alelos *sca2* expandidos tienen un fenotipo clínico y progresión de la enfermedad más severos que individuos heterocigóticos.

5.3.4 Heredabilidad de la varianza residual de la edad de inicio

En poblaciones humanas es difícil diferenciar la familiaridad, que combina factores genéticos y ambientales compartidos por los grupos familiares, de la heredabilidad en sentido estricto, que denota la proporción de la varianza fenotípica atribuible exclusivamente a la varianza genética. En este sentido, la familiaridad se convierte en un estimador de la heredabilidad, representando su límite superior (230). El análisis realizado demostró que tanto como el 48% de la varianza residual de la edad de inicio se debe a factores genéticos y ambientales compartidos por los grupos de hermanos, e independientes al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales y expandidos. Este estimado de heredabilidad de la varianza residual de la edad de inicio es un 7% menor que otro previamente obtenido en pacientes cubanos con SCA2 donde solo fue considerado el número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos como variable independiente (21), y concuerda con estimados de heredabilidad previamente reportados para la enfermedad de Huntington (38-56%) (274, 277, 278). Sorprendentemente, no se han realizado estimaciones de heredabilidad para ninguna otra enfermedad poliglutamínica.

Los resultados obtenidos dan fundamento a la propuesta sobre la existencia de factores genéticos *trans*-actuantes con influencia significativa sobre la edad de inicio de la enfermedad, e implican que tanto como el 52% de la varianza residual de la edad de inicio se debe a factores ambientales no compartidos por los familiares. La identificación de tales factores genéticos y ambientales tiene gran importancia para la comprensión de los mecanismos moleculares vinculados al proceso patológico, para el desarrollo de modelos pronósticos más objetivos, y para la identificación de estrategias terapéuticas potenciales.

5.3.5 Genes modificadores del fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

La probable existencia de genes modificadores del fenotipo clínico en la población cubana de enfermos con SCA2, se fundamenta en que el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos explica entre un 24 y un 89% de la variabilidad observada en marcadores clínicos, lo que implica que entre un 11 y un 76% de dicha variabilidad se debe a factores genéticos adicionales en interacción con el ambiente. Además, la varianza residual de la edad de inicio tuvo una familiaridad del 48%, lo que sugiere la existencia de factores genéticos modificadores e independientes al número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* normales y expandidos.

Para maximizar la potencia estadística en la evaluación de genes candidatos a modificadores del fenotipo clínico en la SCA2, se seleccionó un diseño que incorpora información de enfermos con edades de inicio muy discordantes una vez ajustadas al efecto de los alelos *sca2* normales y expandidos. Los grupos de inicio prematuro y tardío estuvieron separados por dos desviaciones estándar en su edad de inicio residual. Aunque tuvieron alelos *sca2* expandidos muy similares, la edad de inicio media entre ambos grupos difirió en 22.1 años. Significativamente, en los dos grupos el número promedio de unidades de CAG en los alelos *sca2* normales y expandidos fue idéntico al de la muestra total de 530 individuos, lo que implica que la sustancial diferencia obtenida en las edades de inicio promedio entre ambos grupos se debe a factores diferentes a las repeticiones de CAG en el locus *sca2*.

De los genes con secuencias repetitivas de CAG evaluados, sólo los genes *drpla* y *sca3* tuvieron una influencia significativa sobre la edad de inicio, y solo el gen *drpla* mantuvo una influencia significativa después de aplicada la corrección para comparaciones múltiples. El gen *sca3* tuvo una influencia significativa sobre la progresión de la enfermedad. La variación en la secuencia repetitiva de CAG de alelos *drpla* cortos explicó ~12% de la varianza residual de la edad de inicio, valor comparable al efecto de ~13% reportado para el gen *rail*, o de 12.6% para el gen *TP53* en la SCA2 (19, 279), o al efecto de ~13% reportado para el gen *GluR6* en la enfermedad de Huntington (280). Los alelos *sca3* largos explicaron ~26% de la varianza residual de la tasa de progresión de la enfermedad.

Coincidentemente, los genes *drpla* y *sca3* fueron los que mayor variabilidad alélica mostraron en la muestra analizada; la menor variabilidad alélica en los demás genes pudiera ser un factor limitante que impidiera encontrar una asociación significativa entre estos y marcadores del fenotipo clínico. En este sentido, sería necesario en futuros estudios analizar un mayor número de casos para poder llegar a conclusiones definitivas en cuanto al rol de estos otros genes candidatos en la determinación del fenotipo clínico de la enfermedad.

Los resultados alcanzados sugieren la existencia de una relación funcional entre el producto de los genes *drpla* y *sca3* y los mecanismos moleculares involucrados en la SCA2. Hay numerosas evidencias obtenidas a partir de estudios realizados en humanos y en modelos transgénicos y en ensayos de doble híbridos en levadura que apoyan esta hipótesis (22, 209, 281, 282). En particular, Lim *et al.* (281) generaron una red de interacciones de proteínas en la que trece proteínas causantes de ataxias hereditarias, incluyendo a las ataxinas-2 y -3 y a la atrofina-1, están funcionalmente ligadas a un componente principal de modo directo, o a través de proteínas interactoras comunes. De modo significativo, entre las diez proteínas causantes de ataxias hereditarias que estuvieron aisladas del componente principal se encuentran la ataxina-6 y la ataxina-17 (281), lo que se corresponde con los resultados alcanzados.

Estos hallazgos sugieren que algunos de los productos génicos involucrados en ataxias espinocerebelosas desempeñan roles en rutas moleculares comunes que son esenciales para el adecuado funcionamiento y supervivencia de las células de Purkinje cerebelosas. En particular, tanto la atrofina-1 como la ataxina-3 estén funcionalmente catalogadas como co-represoras transcripcionales, la ataxina-2 ha sido vinculada al procesamiento de ARN, a la regulación traduccional y a procesos endocitóticos que involucran al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *por sus siglas en inglés*). Además, la atrofina-1 tiene un rol en la represión de la señalización del EGFR en la *Drosophila melanogaster* (175, 283, 284), ruta en la que la huntingtina expandida y la parkina actúan afectando la internalización del EGFR (187); esta última también regula los niveles de expresión estacionarios de las ataxinas-2 normal y expandida (186).

Tomando en cuenta que la disfunción de las mitocondrias juega un rol importante en la patogénesis de la SCA2 y de otras enfermedades poliglutamínicas (212, 213), conjeturamos que variantes polimórficas del ADN mitocondrial podrían influir sobre la edad de inicio en la SCA2. El polimorfismo 10398G de la subunidad ND3 de la NADH ubiquinona óxido-reductasa (complejo I mitocondrial), fue seleccionado como candidato a modificador de la edad de inicio de la SCA2 basados en su asociación con una disminución del riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson (214); partimos de la hipótesis de que esta variante pudiera tener un efecto neuroprotector similar en la SCA2, que pudiera expresarse a través de su asociación con un inicio más tardío de la enfermedad. Sorprendentemente, se reveló que esta variante está asociada a una edad de inicio más temprana en la SCA2.

Resulta improbable que la no detección de un efecto protector de la variante 10398G se deba a la falta de potencia estadística en el diseño del estudio, por cuanto se seleccionaron individuos con SCA2 altamente discordantes para la edad de inicio ajustada al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos y normales. Es posible que el efecto de la variante 10398G difiera en la enfermedad de Parkinson comparada con la SCA2, o que sea influido por el trasfondo genético

particular y por factores ambientales vistos en esta muestra de individuos cubanos con SCA2. De hecho, la asociación reportada entre el polimorfismo 10398G y una disminución del riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson, no se ha replicado en individuos de distinto origen étnico (215-217). Alternativamente, por ejemplo, la variante 10398G podría estar en desequilibrio de ligamiento con algún otro polimorfismo mitocondrial que influya sobre la edad de inicio en la SCA2.

El limitado número de sujetos disponibles para este estudio, impidió realizar análisis similares para variantes mitocondriales menos comunes. En cualquier caso, los resultados obtenidos no apoyan la hipótesis de un efecto neuroprotector de la variante 10398G en enfermos cubanos con SCA2, y sugiere un rol de esta variante en la exacerbación del proceso patológico. Será necesario replicar este estudio en otras poblaciones con SCA2 para validar los resultados obtenidos, y para valorar una asociación similar en otras enfermedades poliglutamínicas.

Dado que los efectos modificadores encontrados son de modesta magnitud, su aplicabilidad a la estimación de la edad de inicio es limitada. Como resultado, su importancia descansa fundamentalmente en la elucidación de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la SCA2. Debe ser apuntado que la magnitud exacta del efecto sobre el fenotipo clínico de los genes modificadores identificados, depende de la exactitud de varias variables. Cierta grado de error debe esperarse en la determinación de la edad de inicio, o del número de repeticiones de CAG en los loci estudiados (22). Como consecuencia, los resultados alcanzados deben ser replicados para poder demostrar la validez de las asociaciones identificadas.

5.3.6 Interfaz genotipo-ambiente-fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

En el sentido de la presencia o ausencia de la enfermedad, la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 es una afección “simple” -o monogénica-, por cuanto solo es requerida la mutación de un gen para iniciar la cascada patogénica. Sin embargo, en el sentido de la determinación de características clínicas particulares, la SCA2 puede ser vista como una enfermedad “compleja” en la que se combinan múltiples factores en la determinación de la severidad del fenotipo clínico.

Los resultados alcanzados sugieren un modelo en el que a un efecto genético principal, que es el determinante más importante del fenotipo clínico, se combinan factores genéticos adicionales y factores fisiológicos -ambiente interno- con efectos discretos, para modular la severidad del fenotipo clínico. El número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos es el factor genético más importante en la determinación del fenotipo clínico en la SCA2. Este planteamiento se fundamenta en que este factor explica la mayor parte de la variabilidad observada para cada uno de los marcadores clínicos estudiados, con la única excepción de la latencia sacádica cuyos determinantes genéticos y ambientales quedan por descubrir. A este factor genético con efecto principal, se integran el número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* normales, la dosis genética, el número de repeticiones de CAG en los genes *drpla* y *sca3*, y la variante 10398G de la subunidad ND3 de la NADH ubiquinona óxido-reductasa, al menos en la determinación de la edad de inicio y de la progresión de la enfermedad.

A esta componente genética del fenotipo clínico en la SCA2 se combinan factores fisiológicos vinculados al sexo y edad del enfermo, así como al tiempo de evolución de la enfermedad. En efecto, fue demostrado que el tiempo de evolución influye sobre la puntuación total de ataxia, y que el sexo del individuo influye sobre la progresión de la enfermedad. Además, fue demostrado que el sexo y la edad conceptiva del progenitor transmisor de alelos *sca2* expandidos, influyen sobre la inestabilidad intergeneracional de alelos *sca2* expandidos, fenómeno que se expresa clínicamente como la anticipación de la edad de inicio y un aumento de la severidad clínica en generaciones sucesivas de las familias afectadas (12). Los rangos de penetrancia incompleta y completa identificados para la SCA2 y la expresividad variable del fenotipo clínico son, en consecuencia, el resultado de la interconexión funcional de los demás factores genéticos y ambientales identificados como modificadores del fenotipo clínico -y de otros por identificar-, condicionados al número de repeticiones de CAG en alelos *sca2* expandidos.

5.4 Aproximación teórica a los mecanismos patológicos y estrategias terapéuticas potenciales para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Varios mecanismos patológicos se han propuesto para las enfermedades poliglutamínicas, sobre el principio de la ganancia de una función neurotóxica por las proteínas mutantes. Aquí se demostró que para la SCA2 el número de repeticiones de CAG en los alelos expandidos es el principal determinante del fenotipo clínico, lo que unido a la existencia de un efecto de dosis genética sobre la gravedad de la sintomatología clínica, sugiere que los niveles de expresión de la ataxina-2 influyen sobre la severidad clínica. Esto concuerda con que los niveles estacionarios endógenos de ataxina-2 mutante son importantes para la inducción de citotoxicidad celular (187). En consecuencia, se ha propuesto que el silenciamiento de la expresión del gen mutante podría constituir una vía potencial para el tratamiento de estas dolencias.

5.4.1 Plegamiento inapropiado y agregación de la ataxina-2

Las enfermedades poliglutamínicas muestran agregados proteínicos intracelulares como marcador neuropatológico característico, por lo que la formación de estos agregados es considerada como un mecanismo fisiopatológico primario común, si bien este planteamiento es muy controvertido incluso para la SCA2 (10, 218, 219). No obstante, en la mayoría de los estudios realizados la reducción de la agregación alivia la neurotoxicidad, por lo que se ha propuesto el uso de moléculas que inhiban la formación de los agregados poliglutamínicos como estrategia terapéutica potencial para estas enfermedades (61).

El que en el estudio realizado el aumento del número de repeticiones de CAG en el gen *drpla* estuviera asociado a una edad de inicio más temprana, podría significar que las atrofinas-1 nativas con secuencias poliglutamínicas más extendidas podrían contribuir preferencialmente a la formación de los agregados proteicos generados por la ataxina-2 expandida, con el consecuente incremento de la neurotoxicidad. Por el contrario, el que el aumento del número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* y *sca3* normales estuviera asociado a una edad de inicio más tardía, y a una menor progresión de la enfermedad, podría sugerir que son las ataxinas-2 y -3 nativas con secuencias poliglutamínicas menos extendidas las que podrían contribuir preferencialmente a la formación de los agregados proteicos generados por la ataxina-2 expandida.

Es posible que el contexto proteico de la secuencia poliglutamínica de las ataxinas-2 y -3 nativas reduzca la accesibilidad estérica de esta secuencia, lo que se podría traducir en una pobre contribución a la formación de los agregados de ataxina-2 expandida; esto concuerda con los hallazgos referentes a una incorporación muy limitada de ataxina-2 y -3 nativas a las inclusiones intranucleares formadas por la ataxina-2 expandida (208). En efecto, la agregación espontánea de péptidos poliglutamínicos ocurre por una polimerización clásica dependiente de nucleación (285), cuya cinética puede ser incrementada por secuencias poliglutamínicas de tamaño normal, dependiendo de la concentración y longitud de estas, así como de las condiciones del ambiente inmediato (275).

Aun cuando se podrían proponer modelos teóricos alternativos para explicar el posible rol de la atrofina-1, y las ataxinas-2 y -3 nativas en la formación de agregados proteicos generados por la ataxina-2 expandida, la mayoría de los estudios realizados en la SCA2 y en otras enfermedades poliglutamínicas sugieren que la inhibición de la formación de los agregados poliglutamínicos podría ser una estrategia terapéutica potencial para la SCA2.

5.4.2 ¿Desregulación transcripcional en la SCA2?

El hecho de que los genes *drpla* y *sca3* sean modificadores de la edad de inicio y progresión de la SCA2 en el estudio realizado, y que estos codifiquen proteínas con función de co-represores transcripcionales (283, 284, 286), sugiere que la desregulación transcripcional puede ser un mecanismo patológico primario en la SCA2.

Numerosas evidencias sostienen que la desregulación transcripcional está asociada a enfermedades poliglutamínicas (74, 86, 287). Se ha demostrado que la actividad histona acetiltransferasa de varios factores transcripcionales está disminuida en modelos animales de enfermedades poliglutamínicas (87). Dado que varios reguladores transcripcionales que interactúan con proteínas poliglutamínicas tienen actividad acetiltransferasa, y que el balance de la acetilación de las histonas es controlado por histona acetiltransferasas y por histona desacetilasas, la insuficiencia de acetiltransferasas puede ser corregida por la inhibición de

histona desacetilasas (104-106). El uso de inhibidores de histona desacetilasas para el tratamiento de enfermedades poliglutamínicas se ha evaluado en modelos animales para la enfermedad de Huntington y en individuos enfermos (105, 288), con resultados alentadores.

Dada la identificación de los genes *drpla* y *sca3* como modificadores de la edad de inicio y progresión de la SCA2, sería interesante que en estudios futuros se evaluaran los perfiles de expresión génica en la SCA2 para identificar genes anormalmente sub- o sobreexpresados y caracterizar los mecanismos de acción implicados en este proceso, así como evaluar la seguridad y eficacia de inhibidores de histona desacetilasas como agentes terapéuticos potenciales. Si bien la mayoría de los inhibidores de histona desacetilasas disponibles en la actualidad tienen efectos secundarios de importancia, el fenilbutirato tiene un largo historial de seguridad en el tratamiento de la deficiencia de ornitina transcarbamilasa (289).

5.4.3 Estrategias terapéuticas potenciales para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2: de lo básico a lo clínico

La gran mayoría de las investigaciones orientadas a la búsqueda de alternativas para el tratamiento de enfermedades poliglutamínicas han estado centradas en la enfermedad de Huntington. Aunque los resultados obtenidos son potencialmente extrapolables a la SCA2, será necesaria la completa caracterización de los mecanismos de acción de los agentes terapéuticos identificados, antes de que puedan ser utilizadas en la práctica clínica. Por tanto, se impone la necesidad de realizar un mayor esfuerzo en la investigación básica que sustente un determinado abordaje terapéutico para la SCA2.

Los principales desafíos consisten en identificar o desarrollar moléculas que no sean tóxicas, que tengan una adecuada permeabilidad a la barrera hemato-encefálica, y que logren una reversión, al menos parcial, del fenotipo clínico, así como lograr un rápido y seguro traspaso de la investigación básica a la práctica clínica. Los agentes terapéuticos de elección serían aquellos ya aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, *por sus siglas en inglés*), y que por tanto impliquen una vía más expedita hacia el ensayo clínico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos han permitido arribar a las siguientes

Conclusiones

1. El número de repeticiones de CAG mínimo necesario para provocar la manifestación clínica de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 en la población cubana es de 32 unidades y el rango de alelos intermedios, con mayor tendencia a generar mutaciones *de novo* que conlleven a expansiones de CAG que rebasen el umbral patológico, es aquel de 25 a 31 repeticiones de CAG. Además, el rango de penetrancia incompleta se enmarca desde 32 hasta 36 unidades de CAG y el de penetrancia completa desde 37 hasta 79 repeticiones de CAG.
2. Los alelos *sca2* expandidos son muy inestables en su transmisión intergeneracional y esto depende del número de repeticiones de CAG en los mencionados alelos y es influido por el sexo y la edad conceptiva del progenitor transmisor de la mutación; la inestabilidad intergeneracional de estos alelos es mayor en transmisiones paternas y tiende a aumentar en magnitud a medida que avanza la edad conceptiva en transmisiones paternas y a disminuir en transmisiones maternas.
3. El riesgo de heredar la mutación causante de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 disminuye en la descendencia con el avance de la edad de los progenitores, obteniéndose riesgos relativamente bajos a edades reproductivas de la vida -del 33%, 21% y 10% a edades de 30, 40 y 50 años respectivamente-, lo que incrementa el valor de los estimados con fines de asesoramiento genético. Adicionalmente, se obtuvieron estimados probabilísticos de la edad de inicio de la enfermedad, comprobándose que la variación en sólo una repetición

de CAG en los alelos *sca2* expandidos tuvo una influencia significativa sobre estos estimados.

4. El número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2* expandidos es el principal determinante del fenotipo clínico en la SCA2. El número de repeticiones de CAG en los alelos *sca2*, *sca3* y *drpla* normales, así como el polimorfismo mitocondrial *10398G*, constituyen factores genéticos modificadores de la expresividad variable del fenotipo clínico de la SCA2. Adicionalmente, la homocigosis para la mutación en el gen *sca2*, o sea, la doble dosis de alelos *sca2* expandidos, parece implicar la manifestación de un fenotipo clínico más severo, mientras que el tiempo de evolución y el sexo del individuo tienen una influencia sobre el fenotipo clínico de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Aplicar los estimados probabilísticos obtenidos al asesoramiento genético de individuos en riesgo para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, a la identificación de nuevos factores genéticos o ambientales que pudieran influir sobre el fenotipo clínico de la enfermedad y al diseño de ensayos clínicos en busca de opciones terapéuticas para individuos presintomáticos.
2. Desarrollar nuevos modelos predictivos de la edad de inicio de la enfermedad que, sobre la base de los factores genéticos identificados como modificadores, permitan obtener estimados probabilísticos con mayor precisión y confiabilidad.
3. Profundizar en la caracterización del comportamiento intergeneracional de alelos *sca2* intermedios (25-31 repeticiones de CAG) y de la significación clínica de alelos *sca2* con 30 a 36 repeticiones de CAG, a través de estudios neurofisiológicos, de haplotipaje y de secuenciación que permita describir la configuración de la secuencia repetitiva de CAG en estos alelos para evaluar su importancia clínica y genética.
4. Ampliar el estudio de genes candidatos a modificadores del fenotipo clínico, a partir de la identificación de polimorfismos en genes adicionales y de su asociación a marcadores clínicos de la severidad de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klockgether T. Ataxias. Diagnostic procedure and treatment. *Nervenarzt*. 2005; 76(10):1275-83.
2. Manto MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *The Cerebellum* 2005 ; 4:2–6.
3. Silveira I, Miranda C, Guimaraes L, Moreira MC, Alonso I, Mendonca P, *et al.* Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)_n allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol* 2002; 59(4):623-9.
4. Velázquez L, Sánchez G, Almaguer LM, Martínez E, Velásquez M, Escalona K, *et al.* Prevalence and incidence rate of the Spinocerebellar Ataxia in Cuba. *Restorative Neurology and Neurosciences* 2003; 21(6):273.
5. Velázquez-Pérez L, Sánchez Cruz G, Santos Falcón N, Almaguer-Mederos LM, Escalona Batallan K, Rodríguez Labrada R, *et al.* Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguin. *Neuroscience Letters* 2009; 454: 157–160.
6. Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, *et al.* Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol*. 2004; 61(5):727-33.
7. Lorenzetti D, Bohlege S, Zoghbi HY. The expansion of the CAG repeat in ataxin-2 is a frequent cause of autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurology* 1997; 49: 1009-1013.
8. Sinha KK, Worth PF, Jha DK, Sinha S, Stinton VJ, Davis MB, *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in eastern India. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75:448–452.

9. Zhao Y, Tan EK, Law HY, Yoon CS, Wong MC. Prevalence and ethnic differences of autosomal- dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clin Genet* 2002; 62(6): 478-81.
10. Leznicki P. Aggregation and toxicity of the proteins with polyQ repeats. *Postepy Biochem.* 2005; 51(2):215-22.
11. Lastres-Becker I, Brodesser S, Lütjohann D, Azizov M, Buchmann J, Hintermann E, *et al.* Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Genet.* 2008; 17(10):1465-81.
12. Santos N, Aguiar J, Fernández J, Vázquez M, Auburger J, Gispert S, *et al.* Diagnóstico molecular de una muestra de la población cubana con ataxia espinocerebelosa tipo 2. *Biotechn Apl* 1999; 16(4): 219-22.
13. Hussey J, Lockhart PJ, Seltzer W, Wszolek ZK, Payami H, Hanson M, *et al.* Accurate determination of ataxin-2 polyglutamine expansion in patients with intermediate-range repeats. *Genet Test* 2002; 6:217-20.
14. Lima M, Costa MC, Montiel R, Ferro A, Santos C, Silva C, *et al.* Population genetics of wild-type CAG repeats in the Machado-Joseph disease gene in Portugal. *Hum Hered* 2005; 60(3):156-63.
15. Harper PS, Newcombe RG. Age at onset and life table risks in genetic counselling for Huntington's disease. *J Med Genet* 1992;29 (4):239-242.
16. Sequeiros J, Murphy EA. Age of onset and genetic counseling in Machado- Joseph disease. *Am J Med Genet* 1984; 36:126S.
17. Cancel G, Durr A, Didierjean O, Imbert G, Bürk K, Lezin A, *et al.* Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 2. A study of 32 families. *Hum Mol genet* 1997; 6: 709-715.
18. Saleem Q, Choudhry S, Mukerji M, Bashyam L, Padma M, Chakravarthy PA, *et al.* Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: high frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation. *Hum Genet* 2000; 106: 179-187.

19. Chattopadhyay B, Ghosh S, Gangopadhyay PK, Das SK, Roy T, Sinha KK, *et al.* Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci Lett.* 2003; 17; 345(2):93-6.
20. Bauer PO, Zumrova A, Matoska V, Mitsui K, Goetza P. Can ataxin-2 be down-regulated by allele-specific de novo DNA methylation in SCA2 patients? *Medical Hypotheses* 2004; 63: 1018-1023.
21. Pulst SM, Santos N, Wang D, Yang H, Huynh D, Velásquez L, Figueroa KP. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* 2005; 128:2297-2303.
22. Hayes S, Turecki G, Brisebois K, Lopes-Cendes I, Gaspar C, *et al.* CAG repeat in RAI1 is associated with age at onset variability in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Hum Mol Genet* 2000; 9 (12): 1753-58.
23. Harding AE. Clinical features and classification of inherited ataxias. In: Harding AE, Deufel T, editors. *Inherited ataxias*. Vol 61. New York: Raven; 1993. p. 1–14.
24. Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, Seri M, Brussino A, Michielotto C, *et al.* SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 2005; 129:235-42.
25. Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004; 3: 291-304.
26. Mirkin SM. DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Current Opinion in Structural Biology* 2006, 16:351–358.
27. 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.
28. Verkerk AJ, Pierretti M, Sutcliffe JS, Fu HY, Kuhl DP, Pizzuti A. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-914.

29. Parrish JE, Oostra BA, Verkerk AJ, Richards CS, Reynolds J, Spikes IS, Shaffer LG, Nelson DL. Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. *Nature Genet* 1994; 8: 229-235.
30. Aslandis C, Jansen G, Amemiya C, Shutler G, Mahadevan M, Tsilfidio C, *et al.* Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect *Nature* 1992; 355: 548-51.
31. Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LPW. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nature Genet.* 1999; 21: 379-384.
32. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, *et al.* Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423-1427.
33. Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, *et al.* Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature Genet.* 2000; 26: 191-194.
34. Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, *et al.* Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5-prime region of PPP2R2B is associated with SCA12. (Letter) *Nature Genet.* 1999; 23: 391-392.
35. Huntington's disease collaborative research group (HDCRG). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-983.
36. Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, *et al.* Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluyian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 1994; 6: 9-13.
37. Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Servadio A, Beaudet AL, *et al.* Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* 1993; 72: 971-83.

38. Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, *et al.* Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nature Genet* 1996; 14: 285-291.
39. Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X-N, Lopes-Cendes I, *et al.* Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet* 1996; 14: 269-276.
40. Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, *et al.* Identification of the Spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nature Genet* 1996; 14, 277-284.
41. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, *et al.* CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994; 8: 221-228.
42. Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet* 1997; 15: 62-69.
43. Gilles D, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, *et al.* Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genet* 1997; 17: 65-70.
44. Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, *et al.* SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 2001; 10(14):1441-8.
45. Everett CM, Wood NW. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 2004; 127: 2385-2405.
46. Morfini G, Pigino G, Brady ST. Polyglutamine expansion diseases: failing to deliver. *Trends Mol Med.* 2005; 11(2):64-70.
47. Matilla AD, Goold R, Giunti P. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 2006; 129: 1357-1370.

48. Andrew SE, Goldberg P, Hayden MR. Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum Mol Genet* 1997; 6(12): 2005-10.
49. Semaka A, Creighton S, Warby S, Hayden MR. Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clin Genet* 2006; 70: 283–294.
50. Brocklebank D, Gay J, Andresen JM, Roberts SA, The International-Venezuela Collaborative Research Group, Young AB, et al. Repeat instability in the 27–39 CAG range of the HD gene in the Venezuelan Kindreds: counseling implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009; 150B(3):425-9.
51. Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60:1202-1210.
52. La Spada AR. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol.* 1997; 7(3):943-63.
53. Pearson CE, Edamura KN, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews* 2005; 6: 729-742.
54. Nahhas F, Garbern J, Feely S, Feldman GL. An intergenerational contraction of a fully penetrant Huntington disease allele to a reduced penetrance allele: interpretation of results and significance for risk assessment and genetic counseling. *Am J Med Genet Part A* 2009; 149A(4):732-6.
55. Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, *et al.* Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(5):807-12.
56. Wheeler WC, Persichetti F, McNeil SM, Mysore JS, Mysore SS, MacDonald ME, *et al.* Factors associated with CAG repeat instability HD in Huntington disease. *J. Med. Genet.* 2007; 44:695-701.

57. Veitch NJ, Ennis M, McAbney JP, Shelbourne PF, Monckton DG. Inherited CAG·CTG allele length is a major modifier of somatic mutation length variability in Huntington disease. *DNA Repair* 2007; 6: 789-796.
58. Cannella M, Maglione V, Martino T, Ragona G, Frati L, Li G-M, Squitieri F. DNA instability in replicating Huntington's disease lymphoblasts. *BMC Medical Genetics* 2009; 10:11.
59. Gomes-Pereira M, Moncktonb DG. Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: What goes up, could come down. *Mutation Research* 2006; 598:15-34.
60. Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, *et al.* Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 1997; 91, 753-763.
61. Di Prospero NA y Fischbeck KH. Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 756-765.
62. Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, *et al.* Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 1998; 95, 41-53.
63. Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM. Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nature Genetics* 2000; 26: 1-7.
64. Aguiar J, Fernández J, Aguilar A, Mendoza Y, Vázquez M, Suárez J, *et al.* Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neuroscience Letters* 2006; 392:202–206.
65. Kiehl TR, Nechiporuk A, Figueroa KP, Keating MT, Huynh DP, Pulst SM. Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 339: 17-24.

66. Lim J, Crespo-Barreto J, Jafar-Nejad P, Bowman AB, Richman R, Hill DE, Orr HT, Zoghbi HY. Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1. *Nature* 2008; 452:713–8.
67. Futter M, Diekmann H, Schoenmakers E, Sadiq O, Chatterjee K, Rubinsztein DC. Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors. *J Med Genet* 2009; 46:438–446.
68. Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 182-188.
69. Chen CM, Wu YR, Cheng ML, Liu JL, Lee YM, Lee PW, Soong BW, Chiu DT. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 359: 335-340.
70. Mochel F, Charles P, Seguin F, Barritault J, Coussieu C, Perin L, *et al.* Early energy deficit in Huntington Disease: Identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS ONE* 2007; 2(7): e647.
71. Almeida S, Sarmiento-Ribeiro AB, Januário C, Rego AC, Oliveira CR. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 374: 599-603.
72. Li JY, Plomann M, Brundin P. Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends Mol. Med.* 2003; 9: 414-420.
73. Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, *et al.* Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 9158-9167.
74. Okazawa H. Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60: 1427-1439.

75. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, *et al.* Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001; 293: 493-498.
76. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Page` M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, *et al.* Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell*, 2004; 118: 127-138.
77. Szebenyi G, Morfini GA, Babcock A, Gould M, Selkoe K, Stenoien DL, *et al.* Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron* 2003; 40: 41-52.
78. Lee WC, Yoshihara M, Littleton JT. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine containing proteins and block axonal transport in a Drosophila model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 3224-3229.
79. Ross CA. Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 2002; 35: 819-822.
80. Gardian G y Vecsei L. Huntington's disease: pathomechanism and therapeutic perspectives. *J. Neural Transm.* 2004; 111: 1485-1494.
81. Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 49-60.
82. Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, Li XJ, Li SH, Beal MF, *et al.* Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol.* 1999; 46(6):842-9.
83. Sen S, Dash D, Pasha S, Brahmachari SK. Role of histidine interruption in mitigating the pathological effects of long polyglutamine stretches in SCA1: a molecular approach. *Protein Sci* 2003; 12:953-962.
84. Uchihara T, Iwabuchi K, Funata N, *et al.* Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates – a morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol* 2002; 178:124–8.

85. Sengupta S, Ganesh. Non-coding RNAs in polyglutamine disorders: friend or foe? *J Bioscience* 2008; 33(2):303-306.
86. Riley BE, Orr HT. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 2006; 20: 2183-2192.
87. Ying M, Xu R, Wu X, Zhu H, Zhuang Y, Han M, Xu T. Sodium butyrate ameliorates histone hypoacetylation and neurodegenerative phenotypes in a mouse model for DRPLA. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 12580-12586.
88. Barbato C, Ruberti F, Cogoni C. Searching for MIND: MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases. *J Biomed Biotech* 2009; 2009:871313.
89. Li L-B, Yu Z, Teng X, Bonini NM. RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, 2008; 453(7198): 1107-1111.
90. Sengupta S, Lakhotia SC. Altered expression of the noncoding *hsrw* gene enhances poly-Q induced neurotoxicity in *Drosophila*. *RNA Biology* 2006; 3(1): 28-35.
91. Mallik M, Lakhotia SC. RNAi for the large non-coding *hsrw* transcripts suppresses polyglutamine pathogenesis in *Drosophila* models. *RNA Biology* 2009; 6(4): 1-15.
92. Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM. MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Molecular Cell* 2006; 24: 157-163.
93. Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neuroscience* 2008; 28(53):14341-14346.
94. Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Dell'Agnello G, Petrozzi L, Rossi G, Bonuccelli U. Amantadine in Huntington's disease: open-label video-blinded study. *Neurol. Sci.* 2002; 23: S83-S84.
95. Verhagen Metman L, Morris MJ, Farmer C, Gillespie M, Mosby K, Wu J, Chase TN. Huntington's disease: a randomized, controlled trial using the NMDA-antagonist amantadine. *Neurology* 2002; 59: 694-699.

96. O'Suilleabhain P, Dewey RB. A randomized trial of amantadine in Huntington disease. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 996-998.
97. Murman DL, Giordani B, Mellow AM, Johanns JR, Little RJ, Hariharan M, Foster NL. Cognitive, behavioral, and motor effects of the NMDA antagonist ketamine in Huntington's disease. *Neurology* 1997; 49: 153-161.
98. Seppi K, Mueller J, Bodner T, Brandauer E, Benke T, Weirich-Schwaiger H, *et al.* Riluzole in Huntington's disease (HD): an open label study with one year follow up. *J. Neurol.* 2001; 248: 866-869.
99. Ranen NG, Peyser CE, Coyle JT, Bylsma FW, Sherr M, Day L, *et al.* A controlled trial of idebenone in Huntington's disease. *Mov. Disord.* 1996; 11: 549-554.
100. Huntington Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology* 2001; 57: 397-404.
101. Dedeoglu A, Kubilus JK, Yang L, Ferrante KL, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurochem.* 2003; 85: 1359-1367.
102. Verbessem P, Lemiere J, Eijnde BO, Swinnen S, Vanhees L, Van Leemputte M, *et al.* Creatine supplementation in Huntington's disease: a placebo-controlled pilot trial. *Neurology* 2003; 61: 925-930.
103. Beal MF, Ferrante RJ. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nature Rev. Neurosci.* 2004; 5: 373-384.
104. Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, *et al.* Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 2001; 413: 739-743.
105. Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; 100: 2041-2046.

106. Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, *et al.* Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J. Neurosci.* 2003; 23: 9418-9427.
107. Wellington CL, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, *et al.* Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 19831-19838.
108. Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, *et al.* Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Med.* 2000; 6: 797-801.
109. Bonelli RM, Hodl AK, Hofmann P, Kapfhammer HP. Neuroprotection in Huntington's disease: a 2-year study on minocycline. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2004; 19: 337-342.
110. Keene CD, Rodrigues CM, Eich T, Chhabra MS, Steer CJ, Low WC. Tauroursodeoxycholic acid, a bile acid, is neuroprotective in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99: 10671-10676.
111. Sittler A, Lurz R, Lueder G, Priller J, Lehrach H, Hayer-Hart MK, *et al.* Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1307-1315.
112. Karpuj MV, Becher MW, Springer JE, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, *et al.* Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat Med* 2002; 8:143-149.
113. Borrell-Pagès M, Canals JM, Cordelières FP, Parker JA, Pineda JR, Grange G, *et al.* Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HSJ1b and transglutaminase. *J. Clin. Invest.* 2006; 116:1410-1424.
114. Sánchez I, Mahlke C, Yuan J. Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 2003; 421:373-379.
115. Heiser V, Engemann S, Brocker W, Dunkel I, Boeddrich A, Waelter S, *et al.* Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease

- by using an automated filter retardation assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:16400–16406.
116. Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, *et al.* Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med.* 2004; 10:148-154.
117. Desai UA, Pallos J, Ma AAK, Stockwel BR, Thompson LM, Marsh JL, *et al.* Biologically active molecules that reduce polyglutamine aggregation and toxicity. *Human Molecular Genetics* 2006; 15(13): 2114–2124.
118. Williams AJ, Knutson TM, Colomer Gould VF, Paulson HL. In vivo suppression of polyglutamine neurotoxicity by C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) supports an aggregation model of pathogenesis. *Neurobiol Dis.* 2009; 33(3):342-53.
119. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, *et al.* RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nature Med* 2004; 10(8): 816-20.
120. Lindvall O, Kokaia Z, Martínez-Serrano. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nature Med* 2004; 7: 42-50.
121. Wolfgang WJ, Millar TW, Webster JM, Huston JS, Thompson LM, Marsh JL, *et al.* Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. *PNAS* 2005; 102 (32): 11563–11568.
122. Cellini E, Forleo P, Nacmias B, Tdde A, Latorraca S, Piacentini S, *et al.* Clinical and genetic analysis of hereditary and sporadic ataxia in central Italy. *Brain res Bull* 2001; 56(3-4): 363-6.
123. Filla A, De Michele G, Santana L, *et al.* Spinocerebellar Ataxia type 2 in southern Italy: a clinical and molecular study of 30 families. *J Neurol* 1999; 246: 467-471.
124. Chakravarty A, Mukherjee SC. Autosomal dominant cerebellar ataxias in ethnic Bengalees in West Bengal- an Eastern Indian state. *Acta Neurol Scand* 2002; 105(3): 202-8.

125. Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, Mader C, Ochoa A, Yescas P, *et al.* Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Movement Disord* 2007; 22(7): 1050-53.
126. Orozco G, Nodarse FA, Auburger G. Autosomal dominant cerebellar ataxia: Clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguín, Cuba. *Neurology* 1990; 40: 1369-1375.
127. Hernández A, Magariño C, Gispert S, Santos N, Lunkes A, Orozco G, *et al.* Genetic mapping of the spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) locus on chromosome 12q23-24.1. *Genomics* 1995; 25: 433-435.
128. Velázquez PL, Santos FN, García R, Paneque HM, Hechavarría PR. Epidemiología de la ataxia hereditaria cubana. *Rev Neurol* 2001; 32 (7): 606-611.
129. Geschwind D, Perlman S, Figueroa P, Treiman L, Pulst SM. The prevalence and wide clinical spectrum of spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 842-850.
130. Gwinn-Hardy K, Chen JY, Liu HC, Liu TY, Boss M, Seltzer W, *et al.* Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese. *Neurology* 2000; 55(6):800-5.
131. Chin-Song L, Yah-Huei WC, Pei-Chi K, Hsiu-Chen C, Yi-Hsin W. The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol* 2004; 61: 35-38.
132. Socal MP, Emmel VE, Rieder CRM, Hilbig A, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Intrafamilial variability of Parkinson phenotype in SCAs: Novel cases due to SCA2 and SCA3 expansions. *Parkinsonism and Related Disorders* 2008; 1-5.
133. Bürk K, Globas C, Bosch S, Grabber S, Abele M, Brice A, Dichgans J, Daum I, Klockgether T. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 2. *Brain* 1999; 122: 769-777.
134. Le Pira F, Zappalà G, Saponara R, Domina E, Restivo DA, Regio E, *et al.* Cognitive findings in spinocerebellar ataxia type 2: relationship to genetic and clinical variables. *Journal of the Neurological Sciences* 2002; 201(1-2): 53-57.

135. Velázquez-Pérez L, Fernandez-Ruiz J, Diaz R, Gonzalez RP, Ochoa NC, Cruz GS, *et al.* Spinocerebellar ataxia type 2 olfactory impairment shows a pattern similar to other major neurodegenerative diseases. *J Neurol.* 2006; 253(9): 1165-9.
136. Fernández-Ruiz J, Velázquez-Pérez L, Diaz R, Drucker-Colin R, Perez-González R, Canales N, *et al.* Prism adaptation in spinocerebellar ataxia type 2. *Neuropsychologia* 2007; 45(12):2692-8.
137. Abdel-Aleem A, Zaki M. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) in an Egyptian family presenting with polyphagia and marked CAG expansion in infancy. *J Neurol* 2008; 255:413–419.
138. Boesch SM, Müller J, Wenning GK, Poewe W. Cervical dystonia in spinocerebellar ataxia type 2: clinical and polymyographic findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78:520–522.
139. Rottnek M, Riggio S, Byne W, Sano M, Margolis RL, Walker RH. Schizophrenia in a patient with Spinocerebellar Ataxia 2: coincidence of two disorders or a neurodegenerative disease presenting with psychosis? *Am J Psychiatry* 2008; 165(8): 964-967.
140. Trouillas P, Takayanagi T, Hallett M, Currier RD, Subramony SH, Wessel K, *et al.* International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci.* 1997; 145(2):205-11.
141. Schmitz-Hubsch T, du Montcel ST, Baliko L, *et al.* Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology* 2006; 66:1717-1720.
142. Storey E, Tuck K, Hester R, *et al.* Inter-rater reliability of the International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS). *Mov Disord* 2004; **19**:190-2.
143. Schoch B, Regel JP, Frings M, *et al.* Reliability and validity of ICARS in focal cerebellar lesions. *Mov Disord* 2007; 22:2162-2169.
144. Subramony SH. SARA—a new clinical scale for the assessment and rating of ataxia. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3:136–137.

145. Velázquez PL, Medina EE. Características electrofisiológicas en familias asintomáticas de enfermos con Ataxias Espinocerebelosa tipo 2. *Rev Neurol* 1998; 27(160): 955-63.
146. Velázquez LP, Almaguer LM, Santos NF, Hechavarría RP, Sánchez GC, Paneque MH. Ataxia espinocerebelosa tipo 2 en Cuba. Estudio del fenotipo electrofisiológico y su correlación con variables clínicas y moleculares. *Rev Neurol* 2001; 33 (12): 1129-1136.
147. Velázquez-Pérez L, Seifried C, Santos-Falcón N, Abele M, Ziemann U, Almaguer LE, *et al.* Saccade velocity is controlled by polyglutamine size in spinocerebellar ataxia 2. *Annals of Neurology* 2004; 56(3): 444-447.
148. Seifried C, Velázquez-Pérez L, Santos-Falcón N, Abele M, Ziemann U, *et al.* Saccade velocity as a surrogate disease marker in spinocerebellar ataxia type 2. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1039: 524-7.
149. Schöls L, Linnemann Ch, Globas Ch. Electrophysiology in spinocerebellar ataxias: Spread of disease and characteristic findings. *The Cerebellum* 2008; 198–203.
150. Tuin I, Voss V, Kang JS, Kessler K, Rüb U, Notte D, *et al.* Stages of sleep pathology in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Neurology* 2006; 67:1966-72.
151. Boesch SM, Frauscher B, Brandauer E, Wenning GK, Hogl B, Poewe W. Disturbance of rapid eye movement sleep in spinocerebellar ataxia type 2. *Mov Disord* 2006; 21(10):1751-4.
152. Sánchez Cruz G, Velázquez Pérez L, Gómez Peña L, Martínez Góngora E, Castellano Sánchez G, Santos Falcón N. Manifestaciones Disautonómicas en pacientes con Ataxia espinocerebelosa tipo 2 cubana. *Rev Neurol* 2001; 33(5): 428-34.
153. De Joanna G, De Rosa A, Salvatore E, Castaldo I, De Luca N, Izzo R, *et al.* Autonomic nervous system abnormalities in spinocerebellar ataxia type 2: a cardiovascular neurophysiologic study. *J Neurol Sci.* 2008; 275(1-2):60-3.
154. Pradhan C, Yashavantha BS, Pal PK, Sathyaprabha TN. Spinocerebellar ataxias type 1, 2 and 3: a study of heart rate variability. *Acta Neurol Scand.* 2008; 117(5):337-42.
155. Estrada R, Vallés L, Galarraga J. Heredoataxias. Estudio neuropatológico en 3 casos. *Rev Cub Medi* 1980; 19: 225-37.

156. Orozco G, Estrada R, Perry TL, Araña J, Fernandez R, Gonzalez-Quevedo A, *et al.* Dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy from eastern Cuba. Clinical, neuropathological, and biochemical findings. *J Neurol Sci* 1989; 93: 37–50.
157. Estrada R, Galarraga J, Orozco G, Nodarse A, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): morphometric analyses in 11 autopsies. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 306–310.
158. Rub U, Del Turco D, Del Tredici K, De Vos RA, Brunt ER, Reifenberger G, *et al.* Thalamic involvement in a spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) and a spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patient, and its clinical relevance. *Brain* 2003; 126: 1-16.
159. Della Nave R, Ginestroni A, Tessa C, Salvatore E, De Grandis D, Plasmati R, *et al.* Brain white matter damage in SCA1 and SCA2. An in vivo study using voxel-based morphometry, histogram analysis of mean diffusivity and tract-based spatial statistics. *Neuroimage* 2008; 43(1):10-9.
160. Gispert S, Lunkes A, Santos N, Orozco G, Ha-Hao D, Ratzlaff T, *et al.* Localization of the candidate gene D-amino acid oxidase outside the refined 1 cM Region of Spinocerebellar Ataxia 2. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 972-975.
161. Sahba S, Nechiporuk A, Figueroa KP, Nechiporuk T, Pulst SM. Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1. *Genomics* 1998; 47: 359-364.
162. Aguiar J, Santurlidis S, Nowok J, Alexander C, Rudnicki D, Gispert S, Schulz W, Auburger G. Identification of the Physiological Promoter for Spinocerebellar Ataxia 2 Gene Reveals a CpG Island for Promoter Activity Situated into the Exon 1 of This Gene and Provides Data about the Origin of the Nonmethylated State of These Types of Islands. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 254: 315–318.
163. Babovic-Vuksanovic D, Snow K, Patterson MC, Michels VV. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion. *Am J Med Genet* 1998; 79(5):383-7.

164. Mao R, Aylsworth AS, Potter N, Wilson WG, Breningstall G, Wick MJ, *et al.* Childhood-onset ataxia: testing for large CAG-repeats in SCA2 and SCA7. *Am J Med Genet* 2002; 110(4):338-45.
165. Moretti P, Blazo M, Garcia L, Armstrong D, Lewis RA, Roa B, Scaglia F. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) presenting with ophthalmoplegia and developmental delay in infancy. *Am. J. Med. Genet.* 2004; 124A: 392-396.
166. Choudhry S, Mukerji M, Srivastava AK, Jain S, Brahmachari SK. CAG repeat instability at the SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. *Human Mol Genet* 2001; 10(21): 2437-2446.
167. Fernández M, McClaim ME, Martínez RA, Show K, Lipe H, ravits J, Bird TD, La Spada AR. Late-onset SCA2: 33 CAG repeats are sufficient to cause disease. *Neurology* 2000; 55(4): 569-572.
168. Sobczak K, Krzyzosiak WJ. Patterns of CAG Repeat Interruptions in SCA1 and SCA2 Genes in Relation to Repeat Instability. *Human Mutat* 2004; 24:236-247.
169. Kim J-M, Hong S, Kim GP, Choi YJ, Kim YK, Park SS, Kim SE, Jeon BS. Importance of Low-Range CAG Expansion and CAA Interruption in SCA2 Parkinsonism. *Arch Neurol.* 2007; 64(10):1510-1518.
170. Matsuura T, Sasaki H, Yabe I, Hamada K, Hamada T, Shitara M, Tashiro K. Mosaicism of unstable CAG repeats in the brain of spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurol* 1999; 246: 835–839.
171. Giunti P, Sabbadini G, Sweeney MG, Davis MB, Veneziano L, Matuano E, *et al.* The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. Frequency, clinical and genetic correlates. *Brain* 1998; 121: 459-67.
172. Brock GJR, Anderson NH, Monckton DG. Cis-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Hum Mol Genet* 1999; 8(6): 1061-1067.

173. Affaitati A, Cristofaro T, Feliciello A, Varrone S. Identification of alternative splicing of spinocerebellar ataxia type 2 gene. *Gene* 2001; 267: 89-93.
174. Huynh DP, Yang HT, Vakharia H, Nguyen D, Pulst SM. Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(13):1485-96.
175. van de Loo S, Eich F, Nonis D, Auburger G, Nowock J. Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum. *Exp Neurol.* 2009; 215(1):110-8.
176. Fusco FR, Viscomi MT, Bernardi G, Molinari M. Localization of ataxin-2 within the cerebellar cortex of the rat, *Brain Res. Bull.* 2001; 56:343–347.
177. Huynh DP, Del Bigio MR, Ho DH, Pulst SM. Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 232-241.
178. Maine EM, Hansen D, Springer D, Vought VE. *Caenorhabditis elegans* atx-2 Promotes Germline Proliferation and the Oocyte Fate. *Genetics* 2004; 168: 817–830.
179. Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, *et al.* Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 2003; 421(6920):231-7.
180. Shibata H, Huynh DP, Pulst SM. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Hum Mol Genet* 2000; 9 (9): 1303-13.
181. Albrecht M, Golatta M, Wu Ilnner U, Lengauer T. Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271: 3155–3170.
182. Ralser M, Albrecht M, Nonhoff U, Lengauer T, Lehrach H, Krobitsch S. An Integrative Approach to Gain Insights into the Cellular Function of Human Ataxin-2. *J. Mol. Biol.* 2005; 346:203–214.
183. Satterfield TF, Pallanck LJ. Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(16):2523-32.

184. Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, *et al.* Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-Box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(4):1385-96.
185. Satterfield TF, Jackson SM, Pallanck LJ. A Drosophila Homolog of the Polyglutamine Disease Gene *SCA2* Is a Dosage-Sensitive Regulator of Actin Filament Formation. *Genetics* 2002; 162: 1687–1702.
186. Huynh DP, Nguyen DT, Pulst-Korenberg JB, Brice A, Pulst SM. Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death. *Exp Neurol.* 2007; 203(2):531-41.
187. Nonis D, Schmidt MH, van de Loo S, Eich F, Dikic I, Nowock J, Auburger G. Ataxin-2 associates with the endocytosis complex and affects EGF receptor trafficking. *Cell Signal* 2008; 20(10):1725-39.
188. Giuffrida S, Lanza S, Restivo DA, Saponara R, Valvo SC, Le Pira F, Trovato-Salinaro A, Spinella F, Nicolleti A, Condorelli DF. Clinical and molecular analysis of 11 Sicilian *SCA2* families: influence of gender on age at onset. *Eur J Neurol* 1996; 6:301-307.
189. Riess O, Laccone FA, Gispert S, Schols L, Zuhlke C, Vieira-Saecker AM, *et al.* *SCA2* trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics* 1997; 1:59-64.
190. Globas C, du Montcel ST, Baliko L, Boesch S, Depondt C, DiDonato S, *et al.* Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6. *Mov Disord.* 2008; 23(15):2232-8.
191. Schmitz-Hübsch 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; 71:982-9.
192. Netravathi M, Pal PK, Purushottam M, Thennarasu K, Mukherjee M, Jain S. Spinocerebellar ataxias types 1, 2 and 3: Age adjusted clinical severity of disease at presentation correlates with size of CAG repeat lengths. *J Neurol Sci.* 2009; 277(1-2):83-6.
193. Bürk K, Fetter M, Abele M, *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: oculomotor abnormalities in families with *SCA1*, *SCA2*, and *SCA3*. *J Neurol* 1999; 246:789-797.

194. Junck L, Fink J. Machado-Joseph disease and SCA3: The genotype meets the phenotypes. *Neurology* 1996; 46:4-8.
195. van de Warrenburg BPC, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, *et al.* Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: Prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002; 58(5): 702-708.
196. van de Warrenburg BP, Hendriks H, Durr A, van Zuijlen MC, Stevanin G, Camuzat A, *et al.* Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a cohort study in a Dutch–French cohort. *Ann Neurol* 2005; 57:505-512.
197. Spadafora P, Annesi G, Liguori M, Tarantino P, Cutuli N, Carrideo S, *et al.* Gene dosage influences the age at onset of SCA2 in a family from southern Italy. *Clin Genet* 2007; 72: 381-383.
198. Ragothaman M, Sarangmath N, Chaudhary S, Khare V, Mittal U, Sharma S, *et al.* Complex Phenotypes in an Indian Family with Homozygous SCA2 Mutations. *Ann Neurol* 2004; 55:130-133.
199. Ragothaman M, Muthane U. Homozygous SCA2 mutations changes phenotype and hastens progression. *Movement Disorders* 2008; 23(5): 770-701.
200. Almaguer-Mederos LE, González YZ, Almaguer DG, Cuello DA. Efecto de la “dosis genética” sobre el fenotipo clínico en enfermedades poliglutamínicas. *Correo Científico Médico de Holguín* 2008; 12(3).
201. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 3th ed. Garland Science, 2003.
202. Génin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Hum Genet* 2008; 124:357-368.
203. Almaguer-Mederos LE, González YZ, Almaguer DG, Laffita J, Cuello DA. Genes modificadores en enfermedades poliglutamínicas. *Rev. Habanera de Ciencias Médicas*, 2008; 7(1).

204. Andresen JM, Gayán J, Cherny SS, Brocklebank D, Alkorta-Aranburu G, Addis EA, *et al.* Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. *J. Med. Genet.* 2007; 44:44-50.
205. Pérez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM, Pittman RN. Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 1998; 143: 1457-70.
206. Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramory SH, Das SS, *et al.* Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 1997; 19: 333-44.
207. Igarashi S, Koide R, Shimohata T, Yamada M, Hayashi Y, Takano H, *et al.* Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet* 1998; 18: 111-17.
208. Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K. Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias – triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol* 2001; 102:149–52.
209. Jardim L, Silveira I, Pereira ML, do Céu Moreira M, Mendoza P, Sequeiros J, Giugliani R. Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurol Scand* 2003; 107(3): 211-216.
210. Bi W, Ohyama T, Nakamura H, Yan J, Visvanathan J, Justice MJ, Lupski JR. Inactivation of *Rai1* in mice recapitulates phenotypes observed in chromosome engineered mouse models for Smith-Magenis syndrome. *Hum Molec Genet* 2005; 14: 983-995.
211. Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, *et al.* Ablation of P/Q-type Ca^{2+} channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the α_{1A} subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15245-50.

212. Almaguer-Mederos LE, Almaguer Gotay D, González Zaldívar Yanetza, Martínez Góngora E, Bahr Valcarcel Alberto Pablo. Capacidad antioxidante total en pacientes cubanos con ataxia espinocerebelosa tipo 2. *Rev Mex Neuroci* 2005; 6(3): 201-206.
213. Seong IS, Ivanova E, Lee J-M, Choo YS, Fossale E, Anderson MA, *et al.* HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet* 2005; 14(19): 2871-2880.
214. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, *et al.* Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(4):804-811.
215. Huerta C, Castro MG, Coto E, *et al.* Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. *J Neurol Sci.* 2005; 236(1-2): 49-54.
216. Ghezzi D, Marelli C, Achilli A, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(6):748-752.
217. Simon DK, Mayeux R, Marder K, Kowall NW, Beal MF, Johns DR. Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 54(3):703-709.
218. Koyano S, Uchihara T, Fujigasaki H, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K. Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci Lett* 1999; 273(2):117-20.
219. Pang JT, Giunti P, Chamberlain S, An SF, Vitaliani R, Scaravilli T, *et al.* Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases. *Brain* 2002; 125: 656-663.
220. Wiedemeyer R, Westermann F, Wittke I, Nowock J, Schwab M. Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2003; 22: 401-411.
221. Lipinski MM, Yuan J. Mechanisms of cell death in polyglutamine expansion diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 85-90.

222. Viscomi MT, Florenzano F, Amadio S, Bernardi G, Molinari M. Partial resistance of ataxin-2-containing olivary and pontine neurons to axotomy-induced degeneration. *Brain Research Bulletin* 2005; 66:212–221.
223. González-Triana C, Sánchez G, González-Quevedo A, Delgado R, Velásquez L, García JC, *et al.* Serum and Cerebrospinal fluid levels of copper, iron and zinc in patients with Ataxia type SCA-2 from the province of Holguín in Cuba. *Rev. CENIC* 2005; 4: 114.
224. Almaguer-Mederos LE, Rodríguez YA, Martínez EG, Almaguer DG, González YZ, Echevarría RP, *et al.* Antigliadin antibodies in Spinocerebellar Ataxia Type 2 Cuban patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 315-317.
225. Paneque HM, Prieto AL, Reynaldo RR, Cruz MT, Santos FN, Almaguer ML, *et al.* Psychological aspects of presymptomatic diagnosis of spinocerebellar ataxia type 2 in Cuba. *Community Genet.* 2007; 10(3):132-9.
226. Freund H-J, Barnikol UB, Nolte D, Treuer H, Auburger G, Tass PA, *et al.* Subthalamic-thalamic DBS in a case with spinocerebellar ataxia type 2 and severe tremor – an unusual clinical benefit. *Mov Disord* 2007; 22(5):732-5.
227. Denny BD. *Handbook of neurological examination and case recording.* 3rd edition. Cambridge: Ma Harvard University Press; 1960.
228. Sambrook J, MacCallum P, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
229. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 1978; 89: 583-590.
230. Mizushima K, Watanabe M, Abe K, Aoki M, Itoyama Y, Shizuka M, *et al.* Analysis of spinocerebellar ataxia type 2 in Gunma Prefecture in Japan: CAG trinucleotide expansion and clinical characteristics. *J Neurol Sci.* 1998; 156(2):180-5.
231. The Math Works, Inc. *Optimization toolbox user's guide.* Natick MA: The Math Works, Inc, 2002.
232. Falconer D. *Introduction to quantitative genetics.* Wiley, New York, 1989.

233. Ogino S y Wilson RB. Bayesian Analysis and Risk Assessment in Genetic Counseling and Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 2004; 6 (1): 1-9.
234. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. 3th ed. WH Freeman and Company, New York, 1997; pp 207-17.
235. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 1979; 6:65–70.
236. Lewis PO, Zaykin D, 2001. *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data*. Version 1.0 (d16c). Disponible en: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
237. StatSoft, Inc., 2003. *STATISTICA (data analysis software system)*, version 6. Disponible en: <http://www.statsoft.com>.
238. Futamura N, Matsumura R, Fujimoto Y, Horikawa H, Suzumura A, Takayanagi T. CAG repeat expansions in patients with sporadic cerebellar ataxia. *Acta Neurol Scand* 1998; 98: 55-59.
239. Morley JF, Brignull HR, Weyers JJ, Morimoto RI. The threshold for polyglutamine aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Ntl Acad Sci* 2002; 99(16): 10417-22.
240. Tsai HF, Liu CS, Leu TM, Wen FC, Lin SJ, Liu CC, *et al*. Analysis of trinucleotide repeats in different SCA loci in spinocerebellar ataxia patients and in normal population of Taiwan. *Acta Neurol Scand* 2004; 109(5): 355-360.
241. Auburger G, Orozco G, Capote RF, Sánchez SG, Pérez MP, Cueto ME, *et al*. Autosomal dominant ataxia: genetic evidence for locus heterogeneity from a cuban founder effect population. *Am.J.Hum.Genet* 1990; 46: 1163-1177.
242. Organización Mundial de la Salud. *Indicadores de Salud en Cuba, 2002*. Disponible en: <http://www3.who.int/whosis/country/indicators.cfm?country=CUB&language=spanish>.

243. Malandrini A, Galli L, Villanova M, Palmeri S, Parrotta E, DeFalco D, *et al.* CAG repeat expansion in an Italian family with spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): a clinical and genetic study. *Eur Neurol* 1998; 40:164-8.
244. Stevanin G, Giunti P, Belal GD, Dürr A, Ruberg M, Wood N, Brice A. De novo expansion of intermediate alleles in spinocerebellar ataxia 7. *Hum Mol Genet* 1998; 7(11):1809-13.
245. Falush D, Almqvist EW, Brinkmann RR, Iwasa Y, Hayden MR. Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(2):373-85.
246. Takano H, Cancel G, Ikeuchi T, Lorenzetti D, Mawad R, Stevanin G, *et al.* Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1060-1066.
247. Juvonen V, Hietala M, Kairisto V, Savontaus M-L. The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population. *Acta Neurol Scand* 2005; 111:154-162.
248. Schöls L, Gispert S, Vorgerd M, Menezes Vieira-Saecker AM, Blanke P, Auburger G, *et al.* Spinocerebellar ataxia type 2. Genotype and phenotype in German kindreds. *Arch Neurol.* 1997; 54(9):1073-80.
249. Yoon SR, Dubeau L, de Young M, Wexler NS, Arnheim N. Huntington disease expansion mutations in humans can occur before meiosis is completed. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8834-38.
250. Sato T, Oyake M, Nakamura K, Nakao K, Fukusima Y, Onodera O, *et al.* Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(1):99-106.

251. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, *et al.* Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996; 87: 493-506.
252. Kaytor MD, Burright EN, Duvick LA, Zoghbi HY, Orr HT. Increased trinucleotide repeat instability with advanced maternal age. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2135-39.
253. Zhang Y, Monckton DG, Siciliano MJ, Connor TH, Meistrich ML. Age and insertion size dependence of repeat number instability of a human DM1 transgene in individual mouse sperm. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 791-98.
254. Laccone F, Christian W. A recurrent expansion of a maternal allele with 36 CAG repeats causes Huntington disease in two sisters. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1145-1148.
255. Kovtun IV, Welch G, Guthrie HD, Hafner KL, McMurray CT. CAG repeat lengths in X- and Y-bearing sperm indicate that gender bias during transmission of Huntington's disease gene is determined in the embryo. *J Biol Chem* 2004; 279(10):9389-91.
256. Aziz NA, van Belzen MJ, Roos RA. Intergenerational CAG repeat instability is highly heritable in Huntington's disease. *J Med Genet.* 2008; 45(11):766.
257. Chandler JH, Reed TE, Dejong RN. Huntington's chorea in Michigan. *Neurology* 1960; 10: 148-153.
258. Sequeiros J. Machado- Joseph disease: epidemiology, genetics and genetic epidemiology. In Lechtenberg R (ed): *Handbook of Cerebellar Diseases*, pp. 345- 351. Dekker, NY, 1993.
259. Folstein SE, Leigh RJ, Parhad IM, Folstein M. The diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* 1986; 36:1279-83.
260. De Stefano AL, Farrer LA, Maciel P, Gaspar C, Rouleau GA, Coutinho P, Sequeiros J. Gender equality in Machado- Joseph disease. *Nat Genet* 1995; 11: 118-119.
261. Chai Y, Wu L, Griffin JD, Paulson HL. The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem.* 2001; 276(48): 44889-97.

262. Nozaki K, Onodera O, Takano H, Tsuji S. Amino acid sequences flanking polyglutamine stretches influence their potential for aggregate formation. *Neuroreport*. 2001; 12(15):3357-64.
263. Andresen JM, Gayán J, Djoussé L, Roberts S, Brocklebank D, Cherny SS, *et al*. The relationship between CAG repeat length and age of onset differs for Huntington's disease patients with juvenile onset or adult onset. *Ann Hum Genet* 2006; 71: 295-301.
264. Shafrir Y, Gay C, Wilson D, Gomez C. Early-onset spinocerebellar ataxia type 2 with infantile spasms. *Ann Neurol* 2000; 48:533.
265. Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Survival estimates for patients with Machado –Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 2007; 72: 543-545.
266. Rakowicz M, Zdzienicka E, Poniatowska R, Waliniowska E, Sułek A, Jakubowska T, *et al*. Spinocerebellar ataxias type 1 and 2: comparison of clinical, electrophysiological and magnetic resonance evaluation. *Neurol Neurochir Pol*. 2005; 39(4):263-275.
267. D'Abreu A, Franca M, Jr, Lopes-Cendes I, *et al*. The international cooperative ataxia rating scale in Machado-Joseph disease. Comparison with the unified multiple system atrophy rating scale. *Mov Disord* 2007; 22:1976-1979.
268. Kirkwood SC, Siemers E, Bond C, *et al*. Confirmation of subtle motor changes among presymptomatic carriers of the Huntington disease gene. *Arch Neurol* 2000; 57:1040 –1044.
269. Oh AK, Jacobson KM, Jen JC, Baloh RW. Slowing of voluntary and involuntary saccades: an early sign in spinocerebellar ataxia type 7. *Ann Neurol* 2001; 49:801– 804.
270. Penney JB, Vonsattel JP, MacDonald ME, Gusella JF, Myers RH. CAG repeat number governs the development rate in Huntington's disease. *Ann Neurol* 1997; 41: 689-92.
271. Stevanin G, Cancel G, Didiejean O, *et al*. The clinical and molecular spectrum of spinocerebellar ataxia type 3 and Machado-Joseph disease. *Eur J Hum Genet* 1996; 4S1:120.
272. Zhang Y, Leavitt BR, van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, MacDonald ME, *et al*. Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J* 2006; 25: 5896-5906.

273. Kehoe P, Krawczak M, Harper PS, Owen MJ, Jones AL. Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. *J Med Genet.* 1999; 36:108-111.
274. Djousse´ L, Knowlton B, Hayden M, Almqvist EW, Brinkman R, Ross C, *et al.* Interaction of Normal and Expanded CAG Repeat Sizes Influences Age at Onset of Huntington Disease. *Am J Med Genet* 2003; 119A:279-282.
275. Slepko N, Bhattacharyya AM, Jackson GR, Steffan JS, Marsh JL, Thompson LM, Wetzel R. Normal repeat length polyglutamine peptides accelerate aggregation nucleation and cytotoxicity of expanded polyglutamine proteins. *PNAS* 2006; 103(39): 14367-14372.
276. Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, Imamura EU, Speck-Martins CE. Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatric Neurol* 2008; 38(4): 296-299.
277. Li JL, Hayden MR, Almqvist EW, Brinkman RR, Durr A, Dodé C, *et al.* A genome scan for modifiers of age at onset in Huntington disease: The HD MAPS study. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(3):682-7.
278. Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, *et al.* Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(10):3498-503.
279. Chattopadhyay B, Baksi K, Mukhopadhyay S, Bhattacharyya NP. Modulation of age at onset of Huntington disease patients by variations in TP53 and human caspase activated DNase (hCAD) genes. *Neuroscience Letters* 2005;374:81–86.
280. Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, *et al.* Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:3872-3876.
281. Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, Rual JF, *et al.* A protein–protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 2006; 125: 801-814.

282. Lessing D y Bonini NM. Polyglutamine genes interact to modulate the severity and progression of neurodegeneration in *Drosophila*. *Plos Biol* 2008; 6(2): 266-274.
283. Li F, Macfarlan T, Pittman RN, Chakravarti D. Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem* 2002; 277(47): 45004-45012.
284. Wang L, Tsai CC. Atrophin proteins: an overview of a new class of nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Sign* 2008; 6: 1-13.
285. Chen S, Ferrone FA, Wetzel R. Huntington's disease age of onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc Ntl Acad Sci* 2002; 99(18): 11884-11889.
286. Wood JD, Nucifora FC, Duan K, Zhang C, Wang J, Kim Y, *et al.* Atrophin-1, the Dentatorubral and Pallido-luysian Atrophy Gene Product, Interacts with ETO/MTG8 in the Nuclear Matrix and Represses Transcription. *J Cell Biol* 2000; 150(5): 939-948.
287. Sugars KL, Rubinsztein DC. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends in Genetics* 2003; 19(5): 233-238.
288. Butler R, Bates GP. Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. *Nat Rev Neurosc* 2006; 7: 784-796.
289. Burlina AB, Ogier H, Korall H, Trefz FK. Long-term treatment with sodium phenylbutyrate in ornithine transcarbamylase-deficient patients. *Mol Genet Metab* 2001; 72, 351-355.
290. Kanazawa I. Molecular pathology of dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 1999; 354: 1069-1074.
291. Oda M, Maruyama H, Komure O, Morino H, Terasawa H, Izumi Y, *et al.* Possible Reduced Penetrance of Expansion of 44 to 47 CAG/CAA Repeats in the TATA-Binding Protein Gene in Spinocerebellar Ataxia Type 17. *Arch Neurol.* 2004; 61:209-212.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación clínico-genética de las Ataxias Cerebelosas Autosómico Dominantes.

Grupo	Cuadro clínico	Tipo molecular
ADCA I	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome cerebeloso. • Alteraciones adicionales del Sistema Nervioso Central (signos piramidales, extrapiramidales, oftalmoplegia, demencia). 	SCA1, SCA2, SCA3, SCA4, SCA8, SCA12, SCA17, SCA27 y SCA28.
ADCA II	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome cerebeloso. • Maculopatía pigmentaria. 	SCA7.
ADCA III	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome cerebeloso puro. • Alteraciones piramidales moderadas. 	SCA5, SCA6, SCA10, SCA11, SCA14, SCA15, SCA22 y SCA26.
ADCA IV	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome cerebeloso. • Mioclonus y sordera. 	SCA13.

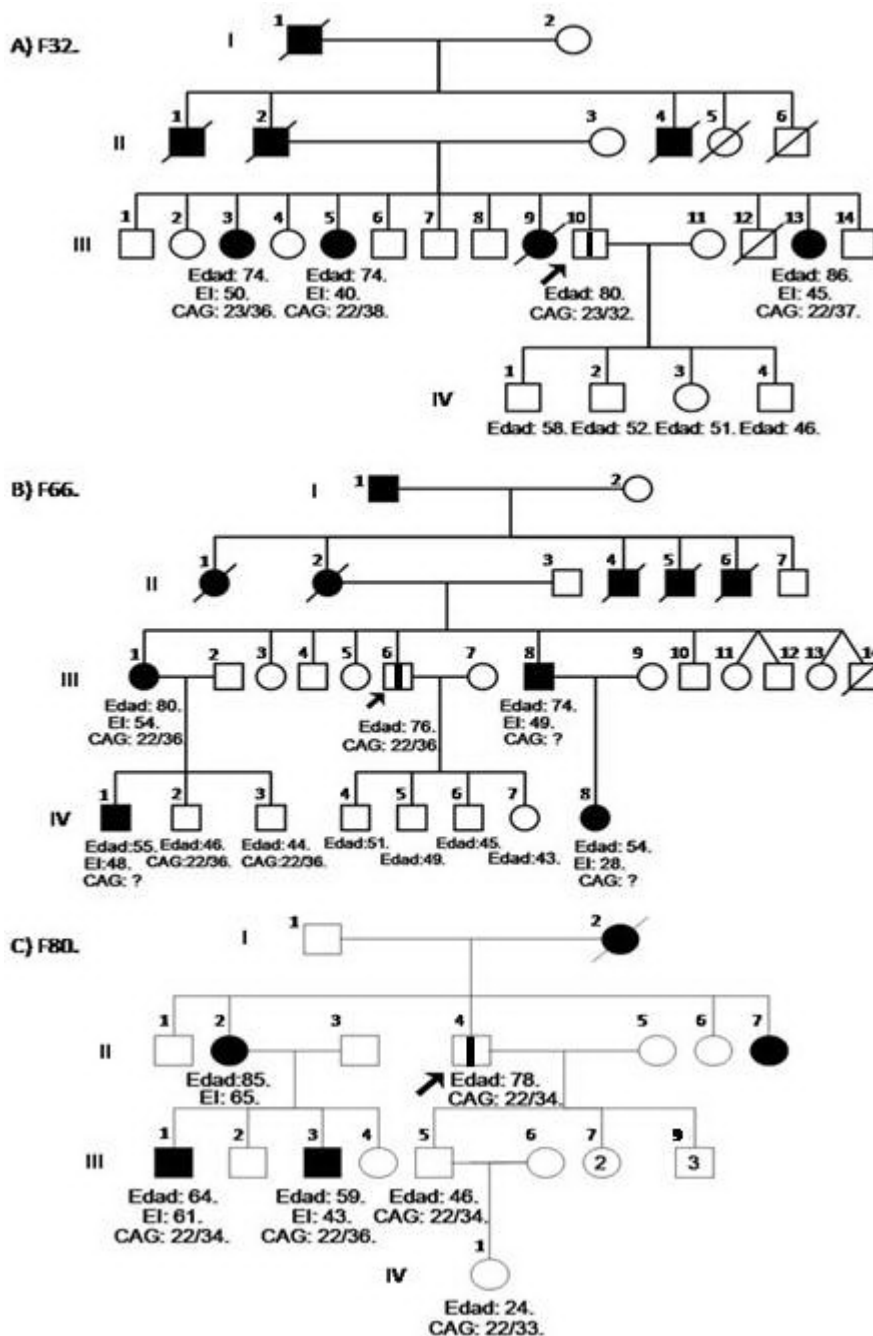
Abreviaturas: ADCA- *del inglés:* Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia; SCA- *del inglés:* Spinocerebellar Ataxia.

Anexo 2. Rangos de referencia de acuerdo con la significación clínica de alelos con diferente longitud de su secuencia repetitiva de CAG en enfermedades poliglutamínicas.

Gen	Locus	Rangos de repeticiones de CAG				Referencias
		Normal	Intermedio	Con Penetrancia Reducida	Con Penetrancia Completa	
<i>IT15</i>	4p16.3	6-26	27-35	36-39	40-250	50, 51
<i>drpla</i>	12p12	7-25	no reportado	57?	49-88	290
<i>AR</i>	Xq11-q12	17-24	no reportado	no reportado	40-55	27
<i>sca1</i>	6p22-p23	6-36	36-38	44?	39-91	1, 195
<i>sca2</i>	12q24.1	13-31	no reportado	32-34	35->500	12, 165
<i>sca3</i>	14q24.3-q32	12-47	48-51	no reportado	53-200	1, 195
<i>sca6</i>	19p13.1-13.2	4-20	no reportado	no reportado	21-33	1, 195
<i>sca7</i>	3p21.1-p12	4-27	28-33	34-36	37-460	1, 195
<i>sca17</i>	6p27	25-42	no reportado	43-48	49-66	1, 291

Abreviaturas: *IT15*- del inglés: Interesting transcript fifteen, gen que codifica para la *huntingtina* y cuya mutación da lugar a la enfermedad de Huntington; *drpla*- gen que codifica para la *atrofina-1* y cuya mutación da lugar a la Atrofia Dentatorubral-Páldoluisiana; *AR*- del inglés: Androgen receptor, gen que codifica para el *receptor de andrógeno* y cuya mutación da lugar a la Atrofia Muscular Espinobulbar; *sca1-17*- genes que codifican para las ataxinas-1-17 y cuya mutación da lugar a las Ataxias Espinocerebelosas tipo 1-17.

Anexo 3. Árboles genealógicos correspondientes a los individuos identificados como “no penetrantes” para el gen *sca2*, pertenecientes a tres familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. (Abreviaturas: EI- edad de inicio de la enfermedad; CAG- número de repeticiones de CAG en el locus *sca2*).



Anexo 4. Estadística descriptiva de las variables clínicas y neurofisiológicas empleadas como marcadores del fenotipo clínico en el estudio.

VARIABLES	Estadígrafos descriptivos				
	n	Rango	Media	D.E	E.E.M
Edad de inicio (años)	530	2-68	33.1	14.03	0.61
Tiempo de evolución (años)	508	1-59	12.1	7.91	0.35
Duración de la vida (años)	99	8-88	46.9	18.29	1.84
Duración de la enfermedad (años)	99	5-38	18.9	7.02	0.71
Puntuación total ICARS	135	13-95	50.1	17.4	1.50
Velocidad sacádica máxima (VSM) (grados/segundo)					
10°	94	50.5-270.0	145.1	45.62	4.71
20°	94	31.5-451.5	201.8	81.77	8.43
30°	94	75.0-608.5	232.8	99.56	10.3
60°	94	29.0-668.5	257.3	117.03	12.1
Latencia sacádica (milisegundos)					
10°	94	110-488	219.4	61.70	6.36
20°	94	96-464	241.4	67.58	6.97
30°	94	111-425	246.1	64.73	6.68
60°	94	56-879	273.8	120.39	12.42
Progresión de la enfermedad					
<i>Puntuación total-ICARS/Edad</i>	135	0.32-3.91	1.37	0.70	0.06
<i>Puntuación total-ICARS/Tiempo de evolución</i>	135	1.20-20.0	5.27	3.33	0.29

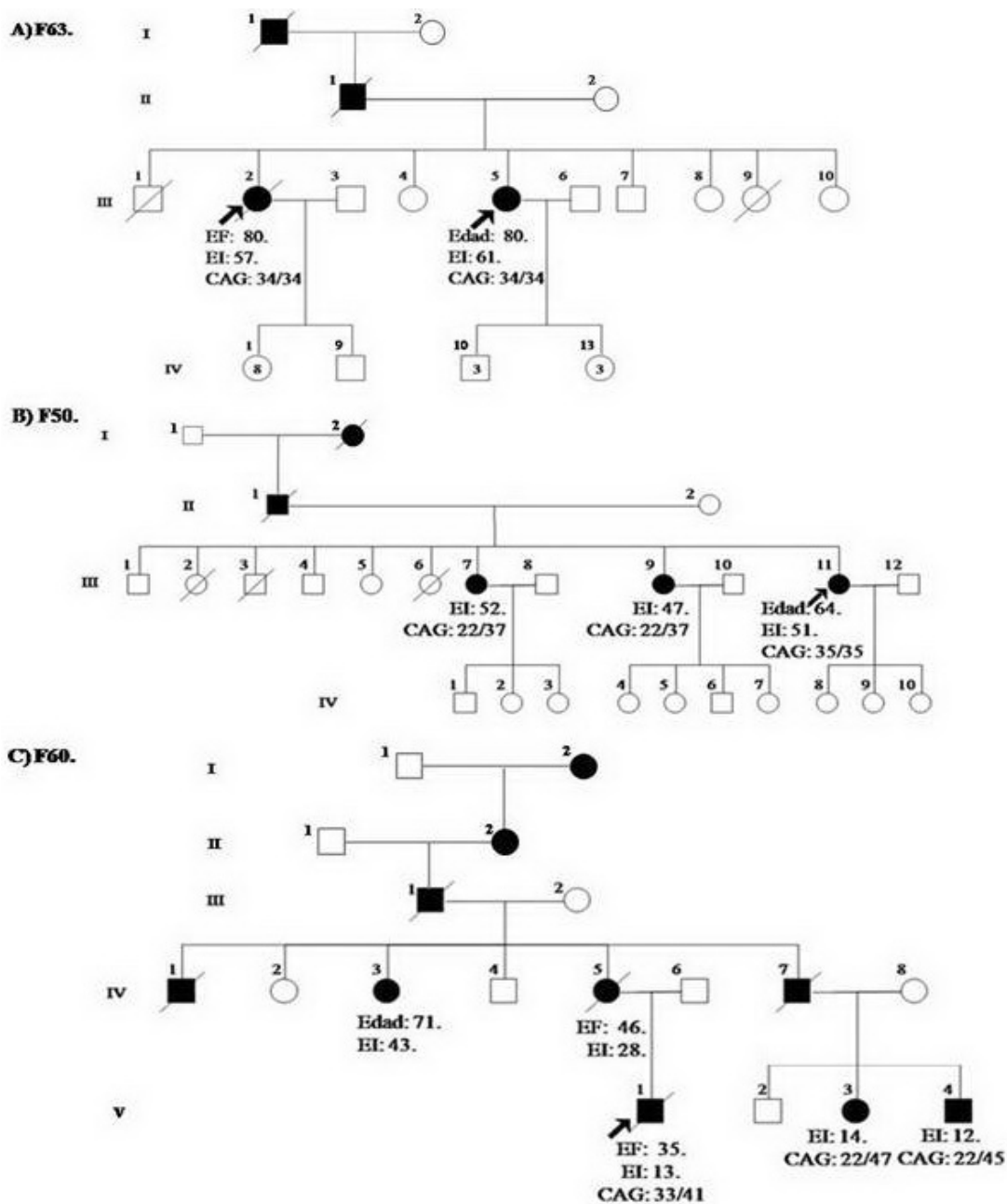
Abreviaturas: n- tamaño muestral; D.E- desviación estándar; E.E.M- error estándar de la media.

Anexo 5. Probabilidad acumulativa de la manifestación de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 a diferentes edades, para un número de repeticiones de CAG dado.

Edad (años)	Probabilidad acumulativa de manifestar la enfermedad (I.C 95%) para un número de repeticiones de CAG de			
	34 (n=36)	35 (n=57)	36 (n=97)	37 (n=130)
10			0.01 ^d (0.0-0.03)	
15				0.01 (0.0-0.03)
20			0.02 ^c (0.0-0.06)	
25	0.03 ^b (0.0-0.09)		0.03 ^b (0.0-0.07)	
30	0.06 ^c (0.0-0.14)	0.02 (0.0-0.06)	0.04 ^c (0.0-0.08)	0.02 (0.0-0.04)
35	0.10 ^d (0.0-0.22)	-	0.08 (0.02-0.14)	0.08 (0.02-0.14)
40	-	-	0.18 (0.08-0.28)	0.18 (0.10-0.26)
45	-	-	0.23 (0.13-0.33)	0.36 (0.26-0.46)
50	-	0.06 (0.0-0.14)	0.37 (0.23-0.51)	0.65 (0.55-0.75)
55	-	0.27 (0.09-0.45)	0.57 (0.43-0.71)	0.80 (0.72-0.88)
60	0.23 (0.0-0.48)	0.55 (0.33-0.77)	0.72 (0.58-0.86)	0.90 ^c (0.82-0.98)
65	0.36 ^c (0.05-0.67)	0.70 (0.46-0.94)	0.86 (0.74-0.98)	1.0 (ND)
70		1.00 ^d (ND)	0.93 ^d (0.81-1.0)	
	38 (n=128)	39 (n=107)	40 (n=90)	41 (n=88)
10		0.02 ^b (0.0-0.04)		
15	0.02 (0.0-0.04)	0.03 (0.0-0.07)		0.01 (0.0-0.03)
20	0.05 ^d (0.01-0.09)	0.05 (0.01-0.09)	0.08 (0.02-0.14)	0.11 (0.03-0.19)
25	0.08 (0.02-0.14)	0.11 (0.05-0.17)	0.15 (0.07-0.23)	0.26 (0.16-0.36)
30	0.17 (0.09-0.25)	0.26 (0.16-0.36)	0.37 (0.25-0.49)	0.54 (0.42-0.66)
35	0.25 (0.17-0.33)	0.50 (0.38-0.62)	0.59 (0.47-0.71)	0.72 (0.60-0.84)
40	0.45 (0.35-0.55)	0.76 (0.66-0.86)	0.80 (0.70-0.90)	0.75 ^a (0.63-0.87)
45	0.64 (0.52-0.76)	0.88 (0.78-0.98)	0.89 (0.81-0.97)	
50	0.72 (0.60-0.84)	0.91 ^c (0.83-0.99)	0.96 (0.88-1.0)	
55	0.80 ^a (0.68-0.92)	0.97 ^d (0.91-1.0)		
60	0.88 ^d (0.78-0.98)			0.88 ^b (0.70-1.0)
	42 (n=54)	43 (n=51)	44 (n=21)	45 (n=16)
10		0.02 ^a (0.0-0.06)	0.05 ^c (0.0-0.15)	0.07 (0.0-0.19)
15	0.04 ^a (0.0-0.10)	0.14 ^a (0.04-0.24)	0.14 ^c (0.0-0.30)	0.40 ^c (0.15-0.65)
20	0.18 (0.06-0.30)	0.51 (0.37-0.65)	0.48 (0.26-0.70)	0.63 (0.38-0.88)
25	0.51 (0.35-0.67)	0.66 (0.52-0.80)	0.72 (0.50-0.94)	0.72 ^e (0.47-0.97)
30	0.78 (0.64-0.92)	0.81 ^d (0.69-0.93)	0.82 ^d (0.60-1.0)	0.81 (0.57-1.0)
35	0.82 ^d (0.68-0.96)			

Abreviaturas: n- tamaño muestral; ^a valores correspondientes a un año mayor; ^b valores correspondientes a dos años mayor; ^c valores correspondientes a un año menor; ^d valores correspondientes a dos años menor; ^e valores correspondientes a tres años menor; ND- no determinado.

Anexo 6. Árboles genealógicos correspondientes a los enfermos identificados como “homocigóticos” para la mutación causante de la SCA2, y pertenecientes a tres familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. (Abreviaturas: EI- edad de inicio de la enfermedad; EF- edad al fallecer; CAG- número de repeticiones de CAG en el locus *sca2*).



AUTOBIBLIOGRAFÍA

AUTOBIBLIOGRAFÍA

Publicaciones que contienen los resultados que se presentan en la tesis (4)

1. Simon DK, Zheng K, Velásquez L, Santos N, **Almaguer L**, Figueroa K, Pulst SM. Mitochondrial complex I gene variant associated with early age at onset in spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol* 2007; 64 (7): 1042-44.
2. **Luis Enrique Almaguer Mederos**, Milena Paneque Herrera, Carlos Leyva Proenza, Yanetza González Zaldivar, Edilberto Martínez Góngora, Dany Cuello Almarales, Luis Velásquez Pérez. Age at onset and genetic risk for spinocerebellar ataxia type 2. *Rev Cub Genet Comun* 2008; 2(2): 23-28.
3. **Almaguer-Mederos LE**, Proenza CL, Rodríguez YA, Escalona KB, Santos NF, Martínez EG, et al. Age-dependent risks in genetic counseling for spinocerebellar ataxia type 2. *Clin Genet* 2008; 74: 571-573.
4. **LE Almaguer-Mederos**, NS Falcon, YR Almira, YG Zaldivar, DC Almarales, EM Gongora, MP Herrera, KE Batallan, RR Armiñan, MV Manresa, GS Cruz, V Chang, G Auburger, S Gispert and LV Perez. Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. *Clin Genet* 2010 (doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01358.x).

Publicaciones relacionadas con el tema de la tesis (8)

1. **Almaguer Mederos Luis Enrique**. Neuropatología molecular de enfermedades poliglutamínicas. *Revista Electrónica “Correo Médico de Holguín”* 2003; 7(3).
2. Luis Velázquez-Pérez, Carola Seifried, Nieves Santos-Falcón, Michael Abele, Ulf Ziemann, **Luis Enrique Almaguer**, et al. Saccade velocity is controlled by polyglutamine size in spinocerebellar ataxia 2. *Ann Neurol* 2004; 56:444–447.
3. Seifried C, Velázquez-Pérez L, Santos-Falcón N, Abele M, Ziemann U, **Almaguer LE**, et al. Saccade velocity as a surrogate disease marker in spinocerebellar ataxia type 2. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1039: 524-7.
4. **Luis Enrique Almaguer Mederos**. Agregación y neurotoxicidad en enfermedades poliglutamínicas. ¿Caminos hacia una terapia para la ataxia espinocerebelosa tipo 2? *Revista Electrónica “Ciencias Holguín”*, 2008 (aceptada).

5. **Luis Enrique Almaguer Mederos**, Yanetza González Zaldivar, Dennis Almaguer Gotay, Dany Cuello Almarales, Efecto de la “dosis genética” sobre el fenotipo clínico en enfermedades poliglutamínicas. Revista Electrónica “Correo Médico de Holguín”, 2008; 12(3).
6. **Almaguer-Mederos LE**, González YZ, Almaguer DG, Laffita JM, Cuello DA. Genes modificadores en enfermedades poliglutamínicas. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2008; 7(1).
7. **Luis Enrique Almaguer Mederos**, José Miguel Laffita Mesa, Yanetza González Zaldivar, Dany Cuello Almarales. Bases genéticas de la ataxia espinocerebelosa tipo 2. Revista Electrónica “Ciencias Holguín”, 2008; (1).
8. Velázquez LP, Cruz GS, Santos NF, **Almaguer-Mederos LE**, Escalona KB, Rodríguez RL, et al. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguin. Neuroscience Letters 2009; 454: 157-160.

Presentaciones en eventos científicos (44) (Internacionales-24, Nacionales-6, Provinciales-14)

1. Inestabilidad intergeneracional de los alelos expandidos en la ataxia espinocerebelosa tipo 2. **Concurso Científico-Técnico Juvenil (BTJ) (Provincial)**. Holguín. Febrero, 2003.
2. Neurophysiological and genotypical correlations in Cuban SCA2. **2^{da} Conferencia de Farmacia y Nutrición**. Ciudad de La Habana. Marzo, 2003.
3. Genética clásica y molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 2. Conferencia impartida en ocasión del **1^{er} Curso Internacional sobre Bases Biomoleculares de Enfermedades por Mutaciones Dinámicas para Estudiantes del Caribe**. Abril, 2003.
4. Diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 2. **1^{er} Taller territorial de Neurorrehabilitación**. Holguín. Junio, 2003.
5. Genética molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 2. **V Simposio de Estrés Oxidativo**. Ciudad de La Habana. Octubre, 2003.
6. Bases genéticas de la ataxia espinocerebelosa tipo 2. **Forum Provincial de Ciencia y Técnica**. Diciembre, 2003.
7. Riesgo genético dependiente de la edad en la ataxia espinocerebelosa tipo 2. **XI Exposición “Forjadores del Futuro” (BTJ)**. Holguín. Junio, 2004.
8. Genética de la ataxia espinocerebelosa tipo 2. **Simposio Internacional de Ciencias Biológicas**. Santiago de Cuba. Septiembre, 2004.

9. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **Concurso Científico-Técnico Juvenil (BTJ) (Provincial)**. Holguín. Febrero, 2005.
10. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **Concurso Científico-Técnico Juvenil (BTJ) (Nacional)**. Ciudad de La Habana. Marzo, 2005.
11. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **Concurso Premio Provincial Anual de la Salud**. Holguín. Abril, 2005.
12. The likelihood of being affected with spinocerebellar ataxia type 2 by a particular age, for a specific CAG size. **VII Jornada Nacional de Ciencias Básicas Médicas Girón-2005**. Instituto Superior de Ciencias Médicas “Victoria de Girón. Ciudad de La Habana. Octubre, 2005.
13. Unexpanded SCA2 CAG repeat sizes influences age at onset of spinocerebellar ataxia type 2 in Cuban patients. **VII Jornada Nacional de Ciencias Básicas Médicas Girón-2005**. Instituto Superior de Ciencias Médicas “Victoria de Girón. Ciudad de La Habana. Octubre, 2005.
14. The probability of being affected with spinocerebellar ataxia type 2 by a particular age, for a specific CAG size. **2^{do} Simposium Internacional de Ataxias Hereditarias**. Holguín. Noviembre, 2005.
15. Molecular genetics of SCA2. Unexpanded SCA2 CAG repeat sizes influences age at onset of spinocerebellar ataxia type 2 in Cuban patients. **2^{do} Simposium Internacional de Ataxias Hereditarias**. Holguín. Noviembre, 2005.
16. Application of the International Cooperative Rating Scale in patients with spinocerebellar ataxia type 2. **2^{do} Simposium Internacional de Ataxias Hereditarias**. Holguín. Noviembre, 2005.
17. Saccadic eye movements as an endophenotype marker in patients and presymptomatic relatives with spinocerebellar ataxia type 2. **2^{do} Simposium Internacional de Ataxias Hereditarias**. Holguín. Noviembre, 2005.
18. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica**. Holguín. Noviembre, 2005.

19. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **Concurso Premio Anual de la Salud (Nacional)**. Ciudad de La Habana. Diciembre, 2005.
20. Influencia de los alelos normales sobre la edad de inicio en pacientes con ataxia espinocerebelosa tipo 2. **3^{er} Encuentro Internacional sobre Enfermedades Visuales y Neuromusculares**. Ciudad de la Habana. Febrero, 2006.
21. Probabilidad de enfermar de ataxia espinocerebelosa tipo 2 a una edad determinada para un número de repeticiones de CAG específico. **3^{er} Encuentro Internacional sobre Enfermedades Visuales y Neuromusculares**. Ciudad de la Habana. Febrero, 2006.
22. Saccadic eye velocity in patients with spinocerebellar ataxia type 2. **3^{er} Encuentro Internacional sobre Enfermedades Visuales y Neuromusculares**. Ciudad de la Habana. Febrero, 2006.
23. Expanded CAG repeat size influences age at onset and electrophysiological parameters in spinocerebellar ataxia type 2. **3^{er} Encuentro Internacional sobre Enfermedades Visuales y Neuromusculares**. Ciudad de la Habana. Febrero, 2006.
24. The probability of being affected with spinocerebellar ataxia type 2 by a particular age, for a definite CAG repeat size. **1^{er} Congreso Internacional de Genética Comunitaria**. Ciudad de la Habana. Mayo, 2006.
25. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **XII Exposición “Forjadores del Futuro” (BTJ) (Provincial)**. Holguín. Septiembre, 2006.
26. Nuevos avances en el conocimiento de la estructura y función de la ataxina-2. **Concurso Premio Anual de la Salud (Provincial)**. Holguín. Septiembre, 2006.
27. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **XV Forum Provincial de Ciencia y Técnica**. Holguín. Noviembre, 2006.
28. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **XII Exposición “Forjadores del Futuro” (BTJ) (Nacional)**. Ciudad de la Habana. Marzo, 2007.

29. Interacción alélica y su influencia sobre el fenotipo clínico en la ataxia espinocerebelosa tipo 2. **2^{do} Forum Tecnológico Especial de Biotecnología**. Holguín. Noviembre, 2007.
30. Estimación del Riesgo Genético y de la Edad de Inicio en Individuos Presintomáticos para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2. **2^{do} Congreso Internacional “Salud y Calidad de Vida”**. Holguín. Noviembre, 2007.
31. Interacción alélica en la determinación de la edad de inicio en pacientes con ataxia espinocerebelosa tipo 2. **Concurso Científico-Técnico Juvenil (BTJ) (Provincial)**. Holguín. Febrero, 2008.
32. Normal SCA2 CAG repeat influences age at onset of spinocerebellar ataxia type 2 in Cuban patients. **4^{to} Congreso Cubano y Primer Encuentro Ibero-Latinoamericano de Neurofisiología Clínica**. Varadero. Marzo, 2008.
33. Survival Analysis For The Estimation Of Age At Onset In Spinocerebellar Ataxia Type 2 Cuban Patients. **4^{to} Congreso Cubano y Primer Encuentro Ibero-Latinoamericano de Neurofisiología Clínica**. Varadero. Marzo, 2008.
34. Interacción alélica en la determinación de la edad de inicio en pacientes con ataxia espinocerebelosa tipo 2. **Concurso Premio Anual de la Salud (Provincial)**. Holguín. Mayo, 2008.
35. Risk estimation and modifiers of clinical severity in spinocerebellar ataxia type 2 patients. **3^{er} Simposium Internacional sobre Ataxias Hereditarias y Demencias en el Caribe**. Guardalavaca. Octubre, 2008.
36. Genetic anticipation in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban families. **3^{er} Simposium Internacional sobre Ataxias Hereditarias y Demencias en el Caribe**. Guardalavaca. Octubre, 2008.
37. Polyglutamine disorders in the Post-genomic era. **3^{er} Simposium Internacional sobre Ataxias Hereditarias y Demencias en el Caribe**. Guardalavaca. Octubre, 2008.
38. Intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients. **3^{er} Simposium Internacional sobre Ataxias Hereditarias y Demencias en el Caribe**. Guardalavaca. Octubre, 2008.

39. Allelic interaction at the SCA2 locus in the determination of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients. **3^{er} Simposium Internacional sobre Ataxias Hereditarias y Demencias en el Caribe**. Guardalavaca. Octubre, 2008.
40. Normal SCA2 alleles influences age at onset of spinocerebellar ataxia type 2 in Cuban patients. **5th Latin American Congress of Clinical Neurophysiology**. México. Octubre, 2008.
41. Complejidad genética en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. **3^{er} Seminario Bienal Internacional Transdisciplinario sobre el Enfoque de la Complejidad**. Camaguey. Febrero, 2009.
42. Características moleculares de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. **Congreso Internacional de Neurología y Neurocirugía**. Ciudad de La Habana. Abril, 2009.
43. SCA3 gene modifies the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients. **IV Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular dentro del Primer Congreso Ibero-Americano de Química Bioquímica, e Ingeniería Química**. Ciudad de La Habana. Octubre, 2009.
44. Inestabilidad intergeneracional del gen SCA2 en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. **XIII Exposición “Forjadores del Futuro” (BTJ) (Nacional)**. Holguín. Septiembre, 2009.

Premios y Distinciones Científico-Técnicas (30)

1. Premio Provincial en el XXIV Concurso Científico-Técnico Juvenil. “Inestabilidad intergeneracional de alelos expandidos en la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2003.
2. Premio Provincial en la XI Exposición “Forjadores del Futuro”. “Riesgo genético dependiente de la edad en la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2004.
3. Reconocimiento. Comisión Municipal del Fórum de Ciencia y Técnica. 2004.
4. Sellos “Forjadores del Futuro”. Consejo Nacional de las Brigadas Técnicas Juveniles. 2004.
5. Premio Provincial en el Concurso Científico-Técnico Juvenil. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2005.
6. Premio Provincial Especial al Mayor Rigor Científico en el Concurso Científico-Técnico Juvenil. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2005.

7. Premio Nacional en el Concurso Científico-Técnico Juvenil. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2005.
8. Premio Relevante Municipal en la 1ra etapa del XVI Fórum de Ciencia y Técnica. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2005.
9. Aldabón “La Periquera” Monumento Nacional. Símbolo de la Ciudad de Holguín. 2005.
10. Mención Nacional en el Concurso Anual de la Salud. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2005.
11. Mención Nacional en el Concurso Anual de la Salud. “La velocidad sacádica es controlada por el tamaño de la expansión poliglutamínica en la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2005.
12. Premio Provincial en el Concurso Anual de la Salud. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2005.
13. Condición de “Hijo Destacado de la Ciudad”. Asamblea Municipal del Poder Popular. 2006.
14. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba. Colaborador. “Ataxia espinocerebelosa tipo 2. Evaluación funcional del efecto neurotóxico de la mutación SCA2”. 2006.
15. Premio Provincial en el Concurso Anual de la Salud. “Nuevos avances en el conocimiento de la estructura y función de la ataxina-2”. 2006.
16. Premio Provincial en la XII Exposición “Forjadores del Futuro”. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2006.
17. Premio Provincial Especial al Mayor Rigor Científico en la XII Exposición “Forjadores del Futuro”. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2006.
18. Premio Relevante Provincial en la 1ra etapa del XVI Fórum de Ciencia y Técnica. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2006.
19. Premio Relevante Provincial en la 1ra etapa del XVI Fórum de Ciencia y Técnica. “Alteraciones de los movimientos sacádicos: una vía para la evaluación del efecto neurotóxico”. 2006.
20. Reconocimiento. Presidencia BTJ Provincial. 2006.

21. Sellos “Forjadores del Futuro”. Consejo Nacional de las Brigadas Técnicas Juveniles. 2006.
22. Premio Nacional en la XII Exposición “Forjadores del Futuro”. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2007.
23. Premio Nacional Especial al Mayor Rigor Científico en la XII Exposición “Forjadores del Futuro”. “Estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en individuos presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2007.
24. Medalla “Abel Santamaría”. Consejo de Estado. Por significativos logros en la actividad científico-técnica y actitud consecuente con los principios revolucionarios. 2007.
25. Reconocimiento. Consejo Provincial de las BTJ. 2007.
26. Premio Relevante Provincial en el II Fórum Tecnológico Especial de Biotecnología. “Interacción alélica y su influencia sobre el fenotipo clínico en la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2007.
27. Premio Relevante Provincial I Fórum Tecnológico Especial Ramal de Salud. “Herramientas para la estimación del riesgo genético y de la edad de inicio en presintomáticos para la ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2008.
28. Premio Provincial en el Concurso Anual de la Salud. “Interacción alélica en la determinación de la edad de inicio en pacientes con ataxia espinocerebelosa tipo 2”. 2008.
29. Premio Internacional “Rafael Estrada” *In Memoriam*. “Risk estimation and modifiers of clinical severity in spinocerebellar ataxia type 2 patients”. 2008.
30. Sello “Forjadores del Futuro”. Consejo Nacional de las Brigadas Técnicas Juveniles. 2008.