Tesis presentada para optar al grado de

Doctora en Ciencias Biomédicas por la Universidad Austral

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ATAXIAS HEREDITARIAS: IMPLEMENTACIÓN DE ESTRATEGIAS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN Y DE LECTURAS LARGAS EN UNA COHORTE ARGENTINA

Lic. Josefina Perez Maturo

Director de Tesis: Dr. Marcelo Kauffman

Co-director de Tesis: Dr. Marcelo Villar

Laboratorio de Medicina de Precisión y Genómica, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional CONICET - Universidad Austral

Laboratorio y Consultorio de Neurogenética, Hospital JM Ramos Mejía

Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral

Pilar, Buenos Aires, Argentina

2024

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Austral, al Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT) y al Hospital J.M. Ramos Mejía por brindarme el espacio y recursos para desarrollar la tesis doctoral. Asimismo, a CONICET por el financiamiento otorgado junto a la UA a través de la beca doctoral que hizo posible que trabajara en este proyecto.

Al Dr. Marcelo Kauffman, director de esta tesis, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y por la orientación y posibilidades de aprendizaje que me ha brindado a lo largo de este camino.

Al Dr. Marcelo Villar por ser Co-director de esta tesis.

A los doctores Sergio Rodríguez-Quiroga y Patricia Vega, neurólogos del grupo de Neurogenética y partícipes fundamentales de esta investigación, cuyo valioso conocimiento, aliento y entusiasmo han sido fundamentales para mi aprendizaje y han dejado una huella significativa en mi camino académico.

Mi reconocimiento se extiende al resto de los miembros del grupo de Neurogenética: Vale, Nancy y Dolo por su colaboración, apoyo y tiempo compartido y en especial a Neri, con quien además entablamos una gran amistad desde el inicio del doctorado.

A la Cátedra de Genética de la UA, y especialmente a la Dra. Atorrasagasti por brindarme la oportunidad de formar parte del plantel docente.

A la Doctora Marcela González-Cid por su colaboración y aporte en estudios de funcionalidad.

También agradezco a los Doctores Luca Marsilli y Alberto Espay, de la Universidad de Cincinnati, por darme la oportunidad de formar parte del proyecto de LRS, que ha sido de relevante para el desarrollo de esta tesis.

A los pacientes y sus familiares por permitir en gran medida que este trabajo se haya llevado a cabo.

Finalmente, y de manera especial a mis amigos y familia, que estando cerca o desde la distancia, me brindaron un constante apoyo que ha sido fundamental para ser perseverante en este desafiante proceso.

RESUMEN

Las ataxias hereditarias (AH) representan una de las consultas más frecuentes en la Neurogenética Clínica. Con más de 50 subtipos identificados, estas enfermedades muestran una gran heterogeneidad genética y fenotípica, lo que dificulta significativamente su diagnóstico molecular. La identificación de la causa genética subyacente es crucial para proporcionar un tratamiento y asesoramiento personalizado a los pacientes.

La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) ha mostrado gran utilidad para estudiar las AH, permitiendo la identificación de nuevos genes y variantes asociadas desde su implementación. Sin embargo, NGS presenta limitaciones, especialmente debido que la secuenciación se basa en la obtención de fragmentos cortos que no permiten, a priori, el análisis de variantes estructurales y elementos repetitivos, estos últimos causales de los subtipos de ataxias más frecuentes. Para superar estas limitaciones, se ha desarrollado la secuenciación de lecturas largas (LRS, por sus siglas en inglés), que genera secuencias continuas desde 10 kilobases (Kb) hasta varios megabases (Mb) directamente a partir de ADN nativo. Esta tecnología en consecuencia ofrece la posibilidad de caracterizar las regiones repetitivas etiopatogénicas del genoma en ataxias causadas por expansiones de nucleótidos.

La escasez de recursos y la gran heterogeneidad de estas enfermedades poco frecuentes destacan la necesidad de métodos de diagnóstico más eficientes y precisos. En Argentina, aunque han habido avances en la comprensión de las AH (41,42), aún falta conocimiento sobre la prevalencia de estos trastornos y los mecanismos mutacionales específicos Además, la identificación de factores modificadores genéticos que podrían influir en la gravedad y el curso clínico de las AH es un área de investigación prometedora en este campo. Conocer la frecuencia de los subtipos de AH en nuestra población y los fenotipos asociados permitiría aplicar una metodología diagnóstica racional, priorizando el estudio de los genes con mayor probabilidad de resultados positivos en cada paciente.

El objetivo general de esta tesis fue contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en las AH, utilizando metodologías novedosas en secuenciación genómica para identificar mutaciones etiopatogénicas y factores modificadores genéticos en una población de pacientes afectados por estos trastornos.

El primer objetivo específico consistió en realizar un análisis sistemático para evaluar exhaustivamente la estrategia de diagnóstico genético-molecular integral implementada por el grupo de Neurogenética de la División de Neurología del Hospital J.M. Ramos Mejía. Se realizó un estudio exploratorio, prospectivo y descriptivo en 334 pacientes con ataxia progresiva evaluados entre mayo de 2008 y diciembre de 2019. Los pacientes fueron estratificados según la probable herencia autosómica dominante, recesiva y esporádica, empleando un algoritmo diagnóstico clínico-

molecular. Los estudios moleculares incluyeron secuenciación de genes individuales, caracterización de expansiones de nucleótidos, secuenciación multigénica de nueva generación, de exoma y genoma completo.

El algoritmo diagnóstico desarrollado permitió identificar el defecto genético en 113 sujetos, obteniendo un rédito diagnóstico del 33.8%. Este porcentaje fue mayor en pacientes con historia familiar positiva (55%), especialmente en ataxias recesivas (71%), lo que destaca la importancia de los antecedentes familiares en el diagnóstico. La ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) (36%) y la de ataxia de Friedreich (AF) (62%) fueron las más prevalentes en nuestra cohorte. Durante el estudio, se construyó un panel multigénico virtual para el análisis de NGS, fundamental para el filtrado y la interpretación clínica de los archivos de variantes VCF (Variant Call Format). Este panel permitió priorizar variantes basadas en modelos de herencia, frecuencia poblacional, función molecular y patogenicidad informada y clasificarlas según los criterios de la ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). .

Para el segundo objetivo, se exploró la utilidad de la secuenciación de tercera generación (LRS) desarrollada por Oxford Nanopore Technologies (ONT) para el diagnóstico de las AH y la caracterización molecular de las regiones etiopatogénicas del genoma en las ataxias causadas por expansiones de TR. Se evaluaron tres estrategias de captura y enriquecimiento de regiones repetitivas: a) CRISPR/Cas9, b) panel de genes, y c) muestreo adaptativo. Con las estrategias b y c se logró cuantificar el número de expansiones y caracterizar la composición de la región repetitiva en genes asociados a SCA1, SCA2, SCA3, SCA17 y AF. Con el muestreo adaptativo, además, se lograron identificar variantes puntuales, lo que amplía el rango de variantes a ser analizadas en un único estudio. Además, el hecho de que el muestreo adaptativo utilice un panel de genes virtual que puede ser fácilmente adaptable a la sintomatología del paciente permite pensar en conjunto con la portabilidad de la tecnología de ONT, en el desarrollo de pruebas moleculares más accesibles, rápidas, abarcativas y personalizadas.

En conclusión, esta investigación logró integrar con éxito los recursos clínicos y de laboratorio académico de un hospital terciario, proporcionando una visión completa del panorama mutacional de las ataxias genéticas en Argentina. Representa la serie más grande de AH estudiadas en nuestra región, sentando las bases para implementar algoritmos de diagnóstico genético de manera más efectiva para estos trastornos en nuestro país. Además, se validó la utilidad de un panel de genes para el análisis de NGS. La exploración de tecnologías de secuenciación de tercera generación permitió, además, evaluar su funcionalidad en este campo y pensar nuevas estrategias de diagnóstico molecular que orienten hacia medicina verdaderamente personalizada. Sin embargo, es evidente que se requiere más trabajo y la implementación de acciones públicas que fomenten un uso más amplio de recursos y tecnologías de diagnóstico avanzadas para mejorar aún más el diagnóstico

en este campo en constante evolución, con el objetivo último de reducir el impacto tanto individual como familiar de estas devastadoras condiciones neurodegenerativas.

ABSTRACT

Hereditary ataxias (HA) are one of the most frequent complaints in Neurogenetics units worldwide. With over 50 identified subtypes, these conditions exhibit considerable genetic and phenotypic heterogeneity, which implicates a complex molecular diagnostic process. Identifying the underlying genetic cause is essential for providing personalized treatment and counseling to affected patients.

Next-generation sequencing (NGS) has been highly effective in the study of HA, enabling the identification of novel genes and associated variants since its introduction. However, NGS has inherent limitations, primarily due to its reliance on short-read sequencing, which is not conducive to analyzing structural variants and repetitive elements, the latter being the cause of the most common ataxia subtypes. To address these limitations, long-read sequencing (LRS) has been developed, generating continuous sequences from 10 kilobases (Kb) to several megabases (Mb) directly from native DNA. This technology provides a powerful tool for characterizing the etiopathogenic repetitive regions of the genome in ataxias caused by nucleotide expansions.

The scarcity of resources and the significant heterogeneity of these rare diseases underscore the need for more efficient and precise diagnostic approaches. In Argentina, despite advances in understanding HA (41,42), there remains a gap in knowledge regarding the prevalence of these disorders and their specific mutational mechanisms. Moreover, the identification of genetic modifier factors that could influence the severity and clinical course of HA represents a promising area of research. Determining the frequency of HA subtypes in the local population and their associated phenotypes would enable a more targeted diagnostic approach, prioritizing the study of genes most likely to yield positive results in each patient.

The overall aim of this thesis was to enhance understanding of the mechanisms underlying HA by employing innovative genomic sequencing methodologies to identify etiopathogenic mutations and genetic modifier factors in a cohort of patients affected by these disorders.

The first specific objective involved conducting a systematic analysis to rigorously evaluate the comprehensive genetic-molecular diagnostic strategy developed by the Neurogenetics Group at the Division of Neurology, J.M. Ramos Mejía Hospital. An exploratory, prospective, and descriptive study was carried out on 334 patients with progressive ataxia who were evaluated between May 2008 and December 2019. Patients were stratified based on likely autosomal dominant, recessive, or sporadic inheritance patterns using a clinical-molecular diagnostic algorithm. Molecular studies included individual gene sequencing, trinucleotide expansion characterization, new generation multigene sequencing and whole exome and genome sequencing.

The diagnostic algorithm developed successfully identified the genetic defect in 113 subjects, achieving a diagnostic yield of 33.8%. This yield was higher among patients with a positive family history (55%), particularly in those with recessive ataxias (71%), highlighting the critical role of family history in diagnosis. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) (36%) and Friedreich's ataxia (FA) (62%) were the most prevalent subtypes in our cohort. A virtual multigene panel for NGS analysis was created during the study, which was essential for filtering and clinically interpreting Variant Call Format (VCF) files. This panel enabled the prioritization of variants based on inheritance patterns, population frequency, molecular function, and reported pathogenicity, classifying them according to the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).

The second objective explored the utility of third-generation sequencing (LRS) developed by Oxford Nanopore Technologies (ONT) for the diagnosis of HA and the molecular characterization of the genome's etiopathogenic regions in ataxias caused by repeat expansions. Three strategies for capturing and enriching repetitive regions were evaluated: (a) CRISPR/Cas9, (b) gene panels, and (c) adaptive sampling. Strategies (b) and (c) facilitated the quantification of repeat expansions and the characterization of repetitive region compositions in genes associated with SCA1, SCA2, SCA3, SCA17, and FA. Additionally, adaptive sampling enabled the identification of single nucleotide variants, broadening the range of variants analyzed in a single study. The use of a virtual gene panel in adaptive sampling, which can be easily tailored to the patient's symptoms, combined with the portability of ONT technology, suggests the potential for developing more accessible, rapid, comprehensive, and personalized molecular tests.

In conclusion, this research successfully integrated the clinical and academic laboratory resources of a tertiary hospital, providing a comprehensive overview of the mutational landscape of genetic ataxias in Argentina. It represents the largest series of HA studied in our region, laying the groundwork for the more effective implementation of genetic diagnostic algorithms for these disorders in our country. The utility of a gene panel for NGS analysis was validated, and the exploration of third-generation sequencing technologies enabled the evaluation of their functionality in this field, fostering the development of novel molecular diagnostic strategies that support truly personalized medicine. However, further work and public policy actions promoting the broader use of advanced diagnostic resources and technologies are necessary to improve diagnosis in this evolving field, ultimately aiming to reduce the individual and familial burden of these devastating neurodegenerative conditions.

PUBLICACIONES

Distintas partes de esta tesis han sido comunicadas parcialmente en las siguientes publicaciones:

Rodríguez-Quiroga S, Perez-Maturo J, Zavala L, Kauffman MA. Novel dominant variant in STUB1 causing ataxia, movement disorders and cognitive impairment: A complex phenotype mimicking SCA17. Neurología Argentina, 2022 July–September;14(3):183-186

Salinas V, Vega P, Marsili L, Pérez-Maturo J, Martínez N, Zavala L, González-Morón D, Medina N, Rodriguez-Quiroga SA, Amartino H, Maxit C, Sturchio A, Grimberg B, Duque K, Comas B, Silva W, Consalvo D, Sfaello I, Espay AJ, Kauffman MA. The odyssey of complex neurogenetic disorders: from undetermined to positive. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2020 Dec;184(4):876-884. doi: 10.1002/ajmg.c.31848. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33084218.

Perez Maturo, J., Gonzalez Cid, M., Zavala, L., Rodriguez Quiroga, S. and Kauffman, M.A. (2020), Novel variants in atm causing mild ataxia-telangiectasia: from benchside to bedside and back again. Mov Disord Clin Pract, 7: 727-729. https://doi.org/10.1002/mdc3.13013.

Perez Maturo J, Zavala L, Vega P, González-Morón D, Medina N, Salinas V, Rosales J, Córdoba M, Arakaki T, Garretto N, Rodríguez-Quiroga S, Kauffman MA. Overwhelming genetic heterogeneity and exhausting molecular diagnostic process in chronic and progressive ataxias: facing it up with an algorithm, a gene, a panel at a time. J Hum Genet. 2020 Oct;65(10):895-902. doi: 10.1038/s10038-020-0785-z. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32488064.

Rodriguez-Quiroga S, Zavala L, Pérez Maturo J, González-Morón D, Garretto N, Kauffman MA. A family with late-onset and predominant choreic niemann pick type c: a treatable piece in the etiological puzzle of choreas. Mov Disord Clin Pract. 2020 Mar 11;7(3):332-334. doi: 10.1002/mdc3.12920. PMID: 32258235; PMCID: PMC7111585.

Córdoba, M., Rodriguez-Quiroga, S. A., Vega, P. A., Salinas, V., Perez-Maturo, J., Amartino, H., Vásquez-Dusefante, C., Medina, N., González-Morón, D., & Kauffman, M. A. (2018). Whole exome sequencing in neurogenetic odysseys: an effective, cost- and time-saving diagnostic approach. PloS one, 13(2), e0191228. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191228

Asimismo, durante la realización del presente doctorado, la aspirante a Doctora ha participado como colaboradora en las siguientes publicaciones:

de Campos Nebel M, Palmitelli M, Pérez Maturo J, González-Cid M. Alternative end-joining originates stable chromosome aberrations induced by etoposide during targeted inhibition of dna-

pkcs in atm-deficient tumor cells. Chromosome Res. 2022 Dec;30(4):459-476. doi: 10.1007/s10577-022-09700-w. Epub 2022 May 23. PMID: 35604590.

Salinas V, Martínez N, Perez Maturo J, Rodriguez-Quiroga SA, Zavala L, Medina N, Amartino H, Sfaello I, Agosta G, Serafín EM, Morón DG, Kauffman MA, Vega P. (2021) clinical next generation sequencing in developmental and epileptic encephalopathies: diagnostic relevance of data re-analysis and variants re-interpretation. Eur J Med Genet. 64(12):104363. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104363. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34673242.

Martínez, N., Rosales, J., Medina, N., Pérez-Maturo, J., Salinas, V., Zavala, L., … & Kauffman, M. (2021). Molecular diagnosis in an argentinean mitochondrial disorders cohort. Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening, 9. https://doi.org/10.1590/2326-4594-jiems-2020-0020

Perez-Maturo J, Vega P, Medina N, Salinas V, Pauni M, Agosta G, Muntadas Rausei J, Kauffman M (2019). Inferring parental gonadal mosaicism in lmna-associated muscular dystrophy by ultra-deep next generation sequencing: a sensitive approach providing valuable information for genetic counseling. Am J Med Genet A. 179(6):1074-1076. doi: 10.1002/ajmg.a.61135.

Salinas V, Vega P, Piccirilli MV, Chicco C, Ciraolo C, Christiansen S, Consalvo D, Perez-Maturo J, Medina N, González-Morón D, Novaro V, Perrone C, García MDC, Agosta G, Silva W, Kauffman, M. (2018) “identification of a somatic mutation in the rheb gene through high depth and ultra-high depth next generation sequencing in a patient with hemimegalencephaly and drug resistant epilepsy”. EurJ Med Genet. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.11.005.

Perez Maturo J, Kauffman M. Salinas V. (2020). Genomic Variability: Germline, Somatic and de novo Variants. Genomic variability in book: Genome Plasticity in Health and Disease.p. 63 – 70

ABREVIATURAS

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics (Colegio Americano de Genética Médica y Genómica)
AD	autosomal dominant (autosómico dominante)
ADCA	autosomal dominant cerebellar ataxia (ataxia cerebelosa autosómica dominante)
ADN	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
ADNc	complementary DNA (ADN complementario)
ADNdc	double-stranded DNA (ADN de doble cadena)
ADNg	Genomic DNA (ADN genómico)
ADNsc	single-stranded DNA (ADN de cadena simple)
AE	episodic ataxia (ataxia episódica)
AF	Friedreich's ataxia (ataxia de Friedreich)
AH	Hereditary Ataxia (Ataxia Hereditaria)
AOA	ataxia with oculomotor apraxia (ataxia con apraxia oculomotora)
AR	autosomal recessive (autosómico recesivo)
ARCA	autosomal recessive cerebellar ataxia (ataxia cerebelosa autosómica recesiva)
ARN	ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
ARNg	Guide RNA (ARN guía)
ARNm	messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensajero)
ARSACS	autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ataxia espástica autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay)
AT	ataxia telangiectasia (ataxia telangiectasia)
CNV	copy number variant (variante en el número de copias)

ddNTPS	dideoxynucleotides (dideoxinucleótidos)
dNTPS	deoxynucleotides (desoxinucleótidos)
DRPLA	dentatorubral-pallidoluysian atrophy (atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana)
EH	Huntington's disease (Enfermedad de Huntington)
HGMD	Human Gene Mutation Database (Base de Datos de Mutaciones Genéticas Humanas)
InDel	insertion-deletion (inserción-deleción)
Kb	kilobase (kilobase)
LRS	Long Read Sequencing (Secuenciación de lectura larga)
LX	X-linked (ligado al cromosoma X)
Mb	megabase (megabase)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
NGS	Next-Generation Sequencing (Secuenciación de próxima generación)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (Herencia Mendeliana en el Hombre en línea)
ONT	Oxford Nanopore Technologies (Tecnologías de Oxford Nanopore)
Pb	base pairs (pares de bases)
PCR	polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
RMN	nuclear magnetic resonance (resonancia magnética nuclear)
SARA	Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (Escala para la Evaluación y Calificación de la Ataxia)
SCA	spinocerebellar ataxia (ataxia espinocerebelosa de herencia autosómica dominante)
SCAR	spinocerebellar ataxia, autosomal recessive (ataxia espinocerebelosa de herencia autosómica recesiva)
SNC	central nervous system (sistema nervioso central)

SNV	single nucleotide variant (variante de nucleótido simple)
TR	Tandem Repeat (repetición en tándem)
TS	targeted sequencing (secuenciación dirigida)
UTR	untranslated region (región no traducida)
VUS	variant of uncertain significance (variante de significado incierto)
WES	whole exome sequencing (secuenciación completa de exomas)
WGS	whole genome sequencing (secuenciación completa del genoma)

* No se mencionan los nombres completos de las abreviaturas de los genes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 15

1.1. ATAXIA: DEFINICIÓN Y PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS 16
1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ATAXIAS 16
1.2.1. Anatómica 16
1.2.2. Etiológica 17
1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS ATAXIAS HEREDITARIAS 17
1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS ATAXIAS HEREDITARIAS EN BASE A SU MODO DE HERENCIA 19
1.4.1. Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCAs) 19
1.4.2. Ataxias cerebelosas autosómicas recesivas (ARCA) 20
1.4.3. Ataxias de herencia ligada al cromosoma X 20
1.4.4. Ataxia Mitocondrial 21
1.5. SUBTIPOS DE ATAXIAS HEREDITARIAS CONOCIDOS HASTA LA FECHA 21
1.6. MECANISMOS MUTACIONALES SUBYACENTES EN LAS ATAXIAS HEREDITARIAS 24
1.7. ABORDAJE DIAGNÓSTICO 27
1.7.1. Examen clínico 28
1.7.2. Diagnóstico Genético-Molecular 28
1.8. INTERPRETACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS 45
1.9. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO 45
1.10. EPIDEMIOLOGÍA 46

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 48

2.1. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN 49
2.2. HIPÓTESIS CENTRAL 50
2.3. OBJETIVOS 50

3. METODOLOGÍA 53

3.1. PROYECTO I 54
3.1.1. Tipo de estudio y Pacientes 54
3.1.2. Examen Clínico 55
3.1.3. Estratificación de los pacientes. 56
3.1.4. Procedimientos de diagnóstico genético 60
3.1.5. Estudio funcional en variantes no reportadas previamente en la literatura 69
3.2. PROYECTO II 71
3.2.1. Aproximación metodológica utilizada 71
3.2.2. Pacientes 73
3.2.3. Procedimiento 74

4. RESULTADOS 89

4.1. PROYECTO I 90

4.1.1. Población Total *90*
4.1.2. Empleo de técnicas de secuenciación masiva en paralelo *109*
4.1.3. Casos ilustrativos *111*
4.2. PROYECTO II 123
4.2.1. Estrategia 1 ..... *123*
4.2.2. Estrategia 2 ..... *125*
4.2.3. Estrategia 3 ..... *133*
5. DISCUSIÓN 136
5.1. PROYECTO I 137
5.2. PROYECTO II 142
6. CONCLUSIONES 147
7. BIBLIOGRAFIA 154
8. ANEXOS 165

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ataxia: definición y principales características

La ataxia (del griego a- que significa "ausencia" o "sin" y taxia- que significa "orden") es un término utilizado para describir un conjunto de trastornos neurológicos caracterizados por la pérdida de la coordinación muscular y del equilibrio. Estos trastornos afectan específicamente las áreas del sistema nervioso central y periférico responsables del control motor y la regulación del tono muscular (1,2).

Existen numerosas enfermedades o condiciones que se manifiestan principalmente con ataxia, acompañada de otros síntomas y signos cerebelosos como disartria (incoordinación del habla), hipotonía, inestabilidad en la marcha, temblor, alteración en los movimientos oculares y vértigo. Algunas condiciones clínicas presentan únicamente ataxia o un síndrome cerebeloso puro, pero en la mayoría de los casos también se observan otras manifestaciones clínicas como convulsiones, deterioro cognitivo, signos piramidales, movimientos anormales, disautonomía y neuropatía periférica. Esta sintomatología afecta la calidad de vida, ya que dificulta la realización de tareas motoras finas y actividades cotidianas, como escribir, vestirse o comer. La falta de coordinación motora también puede llevar a caídas frecuentes, lo que aumenta el riesgo de lesiones, fracturas óseas y contusiones. Además, la ataxia puede afectar negativamente la calidad del sueño, el estado de ánimo y la función cognitiva, lo que puede llevar a la fatiga, la depresión y la disminución de la capacidad de concentración (3,4).

1.2. Clasificación de las ataxias

Existen diversas maneras de clasificar las ataxias, ya sea por la edad de inicio, el ritmo y la evolución clínica, la afectación anatómica o la etiología (3). A continuación, se detallan dos de las clasificaciones más empleadas.

1.2.1. Anatómica

La clasificación anatómica de las ataxias se basa en la región específica del sistema nervioso que origina la disfunción. Se distinguen tres tipos principales: cerebelosas, vestibulares y sensitivas.

- Las ataxias cerebelosas se caracterizan por disfunciones en el cerebelo o sus conexiones. Los síntomas incluyen ataxia, hipotonía, asinergia, dismetría, discronometría, nistagmo, movimientos oculares sacádicos anormales, disdiadococinesia, temblor, espasticidad, neuropatía periférica y disfunción cognitiva. La manifestación y ubicación de estas anomalías dependen de las estructuras cerebelosas afectadas (vestibulocerebelo, espinocerebelo o cerebrocerebelo). Este órgano es crucial para la coordinación motora fina, el equilibrio y el control muscular. Las ataxias cerebelosas pueden tener origen genético o adquirirse como consecuencia de lesiones, trastornos degenerativos, infecciones o causas desconocidas.

- Las ataxias vestibulares se originan por trastornos en el sistema vestibular, responsable del equilibrio y la orientación espacial. La ataxia vestibular produce dificultades importantes con la marcha y las reacciones de equilibrio en sedestación y bipedestación, pudiendo causar vértigo, mareos y problemas de equilibrio.

- Las ataxias sensoriales o sensitivas están vinculadas a complicaciones en el sistema sensorial periférico, tales como los nervios periféricos o las vías sensoriales que transmiten información al cerebro. Este trastorno puede incidir en la propiocepción (la percepción de la posición corporal) y en la sensibilidad táctil. A diferencia de la ataxia cerebelosa, la coordinación es casi normal, pero se ve agravada al cerrar los ojos. Además, la ataxia sensorial no presenta las características asociadas a la ataxia cerebelosa, tales como reflejos pendulares, disartria cerebelosa, nistagmo y movimientos oculares sacádicos anormales (3,5).

1.2.2. Etiológica

- Las ataxias adquiridas o secundarias son aquellas que se desarrollan como resultado de otras condiciones médicas o factores externos. Estas condiciones pueden incluir trastornos autoinmunes, enfermedades metabólicas, lesiones cerebrales traumáticas, tumores cerebrales, infecciones del sistema nervioso central o exposición a sustancias tóxicas.
- La ataxia Idiopática se define como un tipo de trastorno neurológico caracterizado por la presencia de síntomas de ataxia sin una causa identificable conocida o evidente a pesar de una evaluación médica y de laboratorio exhaustiva.
- Las ataxias hereditarias (AH) constituyen un grupo importante dentro de las ataxias y se generan por alteraciones en la secuencia del ADN en genes que codifican proteínas esenciales para el funcionamiento del sistema nervioso. Este tipo de trastornos neurológicos suelen ser progresivos y crónicos (6,7).

1.3. Características de las ataxias hereditarias

Las AH son un grupo genéticamente heterogéneo de enfermedades que, clínicamente, pueden resultar difíciles de distinguir, ya que comparten la característica común de la incoordinación motora resultante de la disfunción del cerebelo y sus conexiones. En términos generales, se manifiestan con una pérdida progresiva de la coordinación muscular, el equilibrio y la capacidad para controlar los movimientos voluntarios (6,8).

Durante el examen neurológico, las características cerebelosas típicas de los pacientes se manifiestan con una marcha amplia y tambaleante, dificultad para caminar en línea recta, inestabilidad al sentarse sin apoyo, problemas al realizar movimientos específicos con las extremidades superiores (como inexactitudes en los movimientos, temblor al finalizar), movimientos alternos rápidos y lentos, problemas en el habla (articulación lenta o confusa, variaciones en tono y

volumen, habla monótona o entrecortada), disfagia (dificultad en la deglución), anomalías de los movimientos oculares como nistagmo, movimientos sacádicos anormales y oftalmoplejía y manifestaciones que no son exclusivamente cerebelosas como dificultades cognitivas o conductuales (8).

Las AH se caracterizan por una marcada heterogeneidad genética y fenotípica. Se han identificado numerosos genes asociados con las AH (**ver tablas 1, 2 y 3 en la sección 1.5)**; cada uno codifica una proteína crucial para el funcionamiento del sistema nervioso, especialmente en la regulación del cerebelo y las vías relacionadas. Estos genes pueden presentar diversas variantes genéticas, cada una con consecuencias diferentes en la manifestación clínica de la enfermedad. A la vez, las AH pueden manifestar diversas formas clínicas. Aunque la falta de coordinación muscular y la ataxia son características comunes, los síntomas adicionales pueden variar ampliamente. La edad de inicio, la gravedad y la progresión de la enfermedad también pueden ser variables, incluso entre los miembros de la misma familia afectados por la misma variante genética.

Esta diversidad de genes y fenotipos asociados resulta en un amplio número de subtipos de AH. Hasta la fecha, se han identificado más de 50 subtipos (**ver Tablas 1,2,3 en la sección 1.5**), cada uno vinculado a genes específicos con distintos patrones de herencia genética, como la herencia autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al cromosoma X o mitocondrial. Los síntomas clínicos pueden variar significativamente entre los diferentes subtipos de AH y también entre diferentes individuos que comparten la misma variante genética (8).

Las AH son consideradas enfermedades raras debido a su baja incidencia en la población en comparación con otras condiciones médicas más comunes. Tienen una prevalencia baja y se presentan de manera relativamente infrecuente. Por ejemplo, la prevalencia de la ataxia espinocerebelosa autosómica dominante tipo 3 (SCA3), también conocida como enfermedad de Machado-Joseph, que es uno de los subtipos más comunes de AH, se estima en alrededor de 1 a 5 casos por cada 100,000 individuos en la población general (2). Sin embargo**,** a pesar de que individualmente son enfermedades raras, las diferentes formas de AH son un motivo frecuente de consulta en el área de Neurogenética.

El diagnóstico de las AH implica una evaluación clínica exhaustiva, pruebas de neuroimagen para identificar cambios estructurales en el sistema nervioso y pruebas genéticas específicas. Estas últimas pueden incluir paneles de genes, secuenciación del exoma o del genoma completo, dependiendo de la sospecha clínica y la historia familiar. La historia familiar proporciona información valiosa sobre el patrón de herencia subyacente de la ataxia, aunque en muchos casos la enfermedad puede manifestarse sin antecedentes familiares aparentes, denominándose ataxias esporádicas en tales situaciones (8).

Las manifestaciones de muchas de las AH más frecuentes suelen hacerse evidentes entre los 30 y 50 años, aunque en otras ataxias se presentan antes de los 25 años (por ejemplo, ataxia con apraxia oculomotora (AOA), ataxia de Friedreich (AF)) o incluso antes de los cinco años (por ejemplo, ataxia telangiectasia (AT)) (9,10).

Dado que actualmente no existen terapias capaces de revertir el desarrollo de la enfermedad en la mayoría de las AH, el enfoque de estos trastornos se centra en tratar los síntomas o tomar medidas preventivas. Se emplean diversas estrategias, entre las que se incluyen terapias de rehabilitación, apoyo psicológico, y el uso de medicamentos. Por ejemplo, en pacientes con AF, se ha observado que la idebenona puede mejorar las manifestaciones cardíacas y neurológicas (8).

1.4. Clasificación de las ataxias hereditarias en base a su modo de herencia

Dado el amplio espectro de síntomas y la heterogeneidad que caracterizan a las HA, su clasificación es todo un desafío. Una clasificación conservadora puede basarse en el modo de herencia, dividiendo este extenso grupo de trastornos en ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA), que incluyen a las ataxias espinocerebelosas (SCAs), ataxias cerebelosas autosómicas recesivas (ARCA), ataxias ligadas al cromosoma X y ataxias mitocondriales (8).

1.4.1. Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCAs)

En el patrón de herencia autosómico dominante, la variante genética asociada a la ataxia se encuentra por lo menos uno de los dos alelos de un autosoma. Los hijos de un individuo heterocigota afectado tienen un riesgo del 50% de heredar la variante y desarrollar la ataxia. La homocigosidad en estos casos es muy poco frecuente, ya que suele ser letal; no obstante, en caso de existir, la descendencia tendría un 100% de probabilidad de heredar la patología. Esta forma de herencia se hace evidente en los árboles genealógicos, ya que, si la penetrancia es completa, la enfermedad se manifiesta en cada generación (11).

La mayoría de las ADCAs son SCAs, a excepción de la Atrofia Dentatorubral-Pallidoluysiana (DRPLA). Las SCAs son generalmente trastornos neurodegenerativos progresivos que comienzan en la edad adulta y afectan tanto al cerebelo como a sus vías aferentes y eferentes. Los síntomas y la edad de inicio suelen superponerse entre los distintos subtipos, aunque ciertos síntomas pueden orientar hacia un subtipo en particular, como los signos piramidales (hiperreflexia y espasticidad), comunes en pacientes con SCA1 y SCA3 (8).

Las SCAs se enumeran según el orden de su descubrimiento, y recientemente se ha llegado a describir más de 50 subtipos (**consultar Tabla 1 en la sección 1.5**). La prevalencia estimada de las SCAs oscila entre 1,0 y 5,6 casos por cada 100,000 habitantes. Entre las SCAs, los subtipos SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y SCA8 son más frecuentes en Estados Unidos y Europa. Sin embargo, la prevalencia de los subtipos de SCA puede variar significativamente en diversas regiones

geográficas, reflejando efectos fundadores (6). Este fenómeno es especialmente evidente en casos como el de SCA36, subtipo más frecuente en la región española de Galicia (12).

1.4.2. Ataxias cerebelosas autosómicas recesivas (ARCA)

Las afecciones con un patrón de herencia autosómico recesivo solo se manifiestan en individuos que son portadores de variantes patogénicas en ambos loci homólogos (dos variantes recesivas idénticas o dos diferentes heterocigotas, una en cada alelo). Los hijos de dos padres portadores tienen un 25% de probabilidades de heredar ambas variantes patogénicas, mientras que los hijos de individuos afectados son portadores obligados de una variante patogénica.

La incidencia de la enfermedad tiende a aumentar en las familias en las que los padres son consanguíneos (emparentados por descendencia). En familias con múltiples afectados, las enfermedades autosómicas recesivas suelen omitir una o más generaciones (11). En muchos casos, los pacientes con AH que siguen este patrón de herencia no presentan antecedentes familiares y se los considera casos esporádicos.

Las ARCAs suelen presentarse en edades tempranas, manifestando síntomas desde la infancia, adolescencia o al comienzo de la edad adulta. Estos síntomas a menudo van acompañados de otras manifestaciones neurológicas y sistémicas, como la neuropatía periférica, que afecta los nervios fuera del cerebro y la médula espinal, provocando síntomas como entumecimiento, hormigueo y debilidad en las extremidades.

Dentro de las ARCAs, la forma más prevalente a nivel mundial es la AF, con una incidencia estimada de 1-2 casos por cada 50.000 personas.(8) Este subtipo de AH se caracteriza por una ataxia progresiva de la marcha, disartria, disfagia, disfunción oculomotora, pérdida de sensación vibratoria, hiporreflexia, escoliosis, pie cavo y en algunos casos diabetes y miocardiopatía (6).

1.4.3. Ataxias de herencia ligada al cromosoma X

En este patrón de herencia, la alteración genética se encuentra en el cromosoma X. Como el cromosoma X se hereda de forma diferente en hombres y mujeres, la prevalencia de la ataxia de herencia ligada al X recesiva suele mayor en hombres. En este caso, las mujeres que son portadoras de una variante patogénica en el gen tienen un riesgo del 50% de transmitir la variante a sus hijos y un 50% de probabilidad de tener hijos varones afectados (11).

En comparación con las ADCAs y ARCAs, las ataxias ligadas al cromosoma X son muy poco frecuentes y el número de subtipos de AH con este patrón de herencia es mucho menor (**ver Tabla 3 en la sección 1.5**). Algunas de ellas sólo se han descrito en unas pocas familias (13). La más frecuente de las ataxias ligadas al cromosoma X es el síndrome de ataxia temblorosa asociada al cromosoma X frágil (FXTAS)(6,13) .

1.4.4. Ataxia Mitocondrial

La ataxia cerebelosa puede ser el resultado de variantes patogénicas en el ADN mitocondrial, el cual presenta una herencia materna característica. Dentro de los trastornos comunes en esta categoría se encuentran el síndrome de Kearns-Sayre, la epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas y la encefalopatía mitocondrial, que se manifiesta con acidosis láctica y episodios similares a ictus (MELAS). La epilepsia es una manifestación frecuente, junto con miopatía, demencia y mioclonía (6).

1.5. Subtipos de ataxias hereditarias conocidos hasta la fecha

Las AH se clasifican en diferentes tipos y subtipos según los genes afectados o la región cromosómica involucrada (en aquellos casos en los que aún no se ha descubierto el gen causante), el patrón de herencia y los síntomas clínicos asociados. En las ADCAs, en general se utiliza la abreviatura SCA seguida por un número y se los ordena en forma creciente de acuerdo con el momento temporal en que fueron descubiertas o propuestas. En las ARCAs puede utilizarse la abreviatura SCAR o el nombre específico. Las **Tablas 1, 2 y 3** presentan una visión exhaustiva de los subtipos de AH conocidos hasta la fecha, incluyendo información relevante como los genes asociados, el modo de herencia, el mecanismo mutacional y el año de descubrimiento.

Tabla 1. Ataxias hereditarias con patrón de herencia autosómico dominante. SNV: *Variante de nucleótido único.* ***InDel:*** *inserción-deleción****.AD:*** *autosómico dominante. OMIM ID obtenido de Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), World Wide Web URL: https://omim.org/.*

Subtipo de ataxia	Gen	Modo de Herencia	Mecanismo Mutacional	Año de Descubrimiento	OMIM ID
DRPLA	*ATN1*	AD	Expansión CAG	1994	125370
SCA1	*ATXN1*	AD	Expansión CAG	1993	164400
SCA2	*ATXN2*	AD	Expansión CAG	1993	183090
SCA3	*ATXN3*	AD	Expansión CAG	1993	109150
SCA4	*ZFHX3*	AD	Expansión GGC	2024	600223
SCA5	*SPTBN2*	AD	SNV	2006	600224
SCA6	*CACNA1A*	AD	Expansión CAG	1994	183086
SCA7	*ATXN7*	AD	Expansión CAG	1997	164500
SCA8	*ATXN8 /ATXN8OS*	AD	Expansión CTG/CAG	1999	608768
SCA10	*ATXN10*	AD	Expansión ATTCT	2000	603516
SCA11	*TTBK2*	AD	SNV, InDel	2007	604432
SCA12	*PPP2R2B*	AD	Expansión CAG/CAA	1999	604326
SCA13	*KCNC3*	AD	SNV	2006	605259
SCA14	*PRKCG*	AD	SNV	2003	605361
SCA15/SCA16	*ITPR1*	AD	SNV, InDels	2007	606658
SCA17	*TBP*	AD	Expansión CAG/CAA	1999	607136
SCA18	No identificado (7q22-q32)	AD	No identificado	2002	607458

SCA19/SCA22	*KCND3*	AD	SNV, deleciones	2012	607346
SCA20	No identificado (11q12.2-11q12.3)	AD	Duplicación (CNV)	2004	608687
SCA21	*TMEM240*	AD	SNV	2014	607454
SCA23	*PDYN*	AD	SNV	2004	610245
SCA25	*PNPT1*	AD	SNV	2004	608703
SCA26	*EEF2*	AD	SNV	2012	609306
SCA27A	*FGF14*	AD	SNV	2003	193003
SCA27B	*FGF14*	AD	Expansión GAA	2023	620174
SCA28	*AFG3L2*	AD	SNV	2010	610246
SCA29	*ITPR1*	AD	SNV	2012	117360
SCA30	No identificado (4q34.3-q35.1)	AD	No identificado	2009	613371
SCA31	*BEAN1*	AD	Expansión ATTTC	2010	117210
SCA32	No identificado (7q32-q33)	AD	No identificado	2010	613909
SCA34	*ELOVL4*	AD	SNV	2014	133190
SCA35	*TGM6*	AD	SNV	2010	613900
SCA36	*NOP56*	AD	Expansión GGCCTG	2011	614154
SCA37	*DAB1*	AD	Expansión ATTTC	2017	615945
SCA38	*ELOVL5*	AD	SNV	2014	615957
SCA40	*CCDC88C*	AD	SNV	2014	616053
SCA41	*TRPC3*	AD	SNV	2015	616410
SCA42	*CACNA1G*	AD	SNV	2015	616795
SCA43	*MME*	AD	SNV	2016	617018
SCA44	*GRM1*	AD	SNV	2017	617691
SCA45	*FAT2*	AD	SNV	2017	617769
SCA46	*PLD3*	AD	SNV	2017	617770
SCA47	*PUM1*	AD	SNV	2018	617931
SCA48	*STUB1*	AD	SNV	2018	618093
SCA49	*SAMD9L*	AD	SNV	2022	619806
SCA50	*NPTX1*	AD	SNV	2022	620158
Enfermedad Gerstmann-Straussler (GSS)	*PRNP*	AD	SNV	1996	137440

Tabla 2 Ataxias hereditarias con patrón de herencia autosómico recesiva. SNV*: Variante de nucleótido único****. AR:*** *autosómico recesivo****. InDel:*** *inserción-deleción OMIM ID obtenido de Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), World Wide Web URL: https://omim.org/.*

Subtipo de Ataxia	Gen	Modo de herencia	Mecanismo Mutacional	Año de Descubrimiento	Omim ID
Ataxia con apraxia oculomotora tipo 2/SCAR1	*SETX*	AR	SNV	2004	606002
SCAR4	*VPS13D*	AR	SNV	2018	607317
SCAR7	*TPP1*	AR	SNV	2013	609270
SCAR8 / ARCA1	*SYNE1*	AR	SNV	2007	618840
SCAR9/ARCA2	*ADCK3*	AR	SNV	2008	612016

SCAR10/ARCA3	*ANO10*	AR	SNV	2010	613728
SCAR11	*SYT14*	AR	SNV	2011	614229
SCAR12	*WWOX*	AR	SNV	2014	614322
SCAR13	*GRM1*	AR	SNV	2012	614831
SCAR14	*SPTBN2*	AR	SNV	2012	615386
SCAR15	*RUBCN*	AR	SNV	2010	615705
SCAR16	*STUB1*	AR	SNV	2013	615768
SCAR17	*CWF19L1*	AR	SNV	2014	616127
SCAR18	*GRID2*	AR	SNV	2013	616204
SCAR20	*SNX14*	AR	SNV	2014	616354
SCAR21	*SCYL1*	AR	SNV	2011	616719
SCAR22	*VWA3B*	AR	SNV	2016	616948
SCAR23	*TDP2*	AR	SNV	2014	616949
SCAR24	*UBA5*	AR	SNV	2016	617133
SCAR25	*ATG5*	AR	SNV	2016	617584
SCAR26	*XRCC1*	AR	SNV	2017	617633
SCAR27	*GDAP2*	AR	SNV	2018	618369
SCAR28	*THG1L*	AR	SNV	2016	618800
SCAR29	*VPS41*	AR	SNV	2020	619389
SCAR30	*PITRM1*	AR	SNV	2016	619405
SCAR31	*ATG7*	AR	SNV	2021	619422
SCAR32	*PRDX3*	AR	SNV	2021	619862
SCAR33	*RNU12*	AR	SNV	2017	620208
Ataxia con deficiencia de vitamina E	*TTPA*	AR	SNV	1995	277460
Ataxia de Wilson	*ATP7B*	AR	SNV	1993	277900
Ataxia telangiectasia	*ATM*	AR	SNV, InDel	1995	208900
Ataxia de Friedreich	*FXN*	AR	Expansión GAA, SNV	1996	229300
Ataxia con apraxia oculomotora tipo 1	*APTX*	AR	SNV	2001	208920
Ataxia cerebelosa e hipogonadismo hipogonadotrópico	*RNF216*	AR	SNV	2002	212840
Ataxia con apraxia oculomotora tipo 3	*PIK3R5*	AR	SNV	2012	611317
Ataxia, combinada con diabetes mellitus y pérdida auditiva cerebelar y periférica	*DNAJC3*	AR	SNV	2014	616192
Ataxia espástica tipo 2	*KIF1C*	AR	SNV	2014	611302
Xantomatosis cerebrotendinosa (CTX)	*CYP27A1*	AR	SNV	1991	213700
Síndrome de ataxia mitocondrial recesiva (incluye SANDO y SCAE)	*POLG*	AR	SNV	2003	607459
Síndrome de Marinesco-Sjogren	*SIL1*	AR	SNV	2005	248800
Ataxia espinocerebelosa de inicio infantil; iosca	*TWNK(C10orf2)*	AR	SNV	2005	271245
Ataxia cerebelosa, tipo caimán (ATCAY)	*ATCAY*	AR	SNV	2003	601238
Atrofia óptica plus	*OPA*	AD/AR	SNV, InDel	2003	125250
Enfermedad de Niemann-Pick tpo C1	*NPC-1*	AR	SNV InDel	1997	607623
Enfermedad de Niemann-Pick tpo C2	*NPC-1*	AR	SNV, InDel	2003	601015
Niemann-Pick tipo A	*SMPD1*	AR	SNV	1991	257200
Ataxia telangiectasia-like 1	*MRE11A*	AR	SNV	1999	604391

Ataxia espinocerebelosa, autosómica recesiva, con neuropatía axonal 1	*TDP1*	AR	SNV	2002	607250
Ataxia cerebelosa, retraso del desarrollo intelectual y síndrome de desequilibrio 3	*CA8*	AR	SNV	2009	613227
Ataxia cerebelosa, retraso del desarrollo intelectual y síndrome de desequilibrio 2 (CAMRQ2)	*WDR81*	AR	SNV	2011	610185
Síndrome de ataxia cerebelosa, neuropatía y arreflexia vestibular (CANVAS)	*RFC1*	AR	Expansión AAGGG	2019	614575
Xantomatosis cerebrotendinosa (CTX)	*CYP27A1*	AR	SNV	1991	213700
Síndrome de mioclonías en acción -Insuficiencia Renal	*SCARB2*	AR	SNV	2008	254900
Síndrome de Joubert	*CC2D2A*	AR	SNV	2008	612285
Ataxia espástica autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)	*SACS*	AR	SNV	2000	270550

Tabla 3. Ataxias hereditarias con patrón de herencia ligadas al cromosoma X. SNV: *Variante de nucleótido único.* ***XLD:*** *Ligado al X dominante.* ***XLR:*** *Ligado al X recesivo Omim ID obtenido de Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), {date}. World Wide Web URL: https://omim.org/.*

Ataxia	Gen	Tipo de Herencia	Mecanismo Mutacional	Año de Descubrimiento	Omim ID*
Ataxia temblorosa asociada al cromosoma X frágil (FXTAS)	*FMR1*	XLD	Expansión CGG	2001	300623
Anemia sideroblástica ligada al X con ataxia (XLSA)	*ABCB7*	XLR	SNV, InDel	1999	301310
Charcot-Marie-Tooth Neuropathy (CMT1X)	*GJB1*	XLD	SNV	2000	304040
Ataxia espinocerebelosa, ligada al cromosoma X-1 (SCAX1)	*ATP2B3*	XLR	SNV	2000	302500
Ataxia, intermitente, con deficiencia de piruvato deshidrogenasa	*PDHA1*	XLD	SNV. InDel	1989	300502

1.6. Mecanismos mutacionales subyacentes en las ataxias hereditarias

Las AH pueden ser causadas por diversos mecanismos mutacionales, incluyendo expansiones de secuencias repetitivas, variantes de uno o varios nucleótidos y, más raramente, variantes del número de copias (CNV). Comprender estos mecanismos es crucial para el diagnóstico y el desarrollo de estrategias terapéuticas.

Las formas más prevalentes de estas enfermedades se vinculan comúnmente con la expansión de repeticiones de secuencias específicas en el ADN. Dichas secuencias repetitivas, conocidas como repeticiones en tándem (TR), normalmente constan de tres a seis bases de longitud

y se encuentran en un número variable de repeticiones dentro de diversos genes en todos los individuos. En ciertas ocasiones, estas regiones de repetición pueden volverse inestables durante la replicación, dando lugar a deleciones de repeticiones, que raramente generan complicaciones, o a la expansión del número de repeticiones. Cuando estas repeticiones superan un umbral crítico, pueden interferir con la transcripción y traducción del gen, resultando en la producción de proteínas anómalas o en una disminución en la cantidad de proteínas normales. En orden creciente de tamaño de repeticiones, los alelos suelen clasificarse en: alelos normales, alelos normales mutables (con mayor probabilidad de expandirse en la siguiente generación), alelos premutados (con riesgo de expansión a rango patogénico en la descendencia), alelos de penetrancia reducida (que pueden o no causar síntomas) y alelos de penetrancia completa (que causan la enfermedad).

Las expansiones de TR más frecuentes son las expansiones CAG. Estas repeticiones se conocen también como repeticiones poliglutamínicas o poliQ, dado que el código genético CAG codifica para el aminoácido glutamina, y estas repeticiones forman cadenas de glutaminas (Q) en la región codificante. Ejemplos de AH vinculadas a expansiones de poliglutamina incluyen SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 y DRPLA. Además, las TR pueden localizarse tanto en los intrones como en las regiones no traducidas del gen (UTR), interfiriendo así en la expresión del gen como sucede en la AF (GAA)(14), SCA8 (CTG), SCA10 (ATTCT)(15), SCA12 (CAG), SCA31 (TGGAA) y SCA36 (GGCCTG) (**Figura 1**). La longitud de la expansión generalmente presenta una correlación inversa con la edad de inicio y la intensidad de los síntomas (6,13).

En las ADCAs ocasionadas por repeticiones trinucleotídicas CAG, es frecuente observar el fenómeno conocido como anticipación. El fenómeno de anticipación tiene importantes implicancias clínicas y para el asesoramiento genético, ya que los miembros más jóvenes de una familia afectada pueden desarrollar síntomas más severos y a una edad más temprana que sus padres o abuelos. En ciertas ADCAs, como DRPLA y SCA7, las repeticiones CAG son particularmente inestables, lo que intensifica la manifestación de la anticipación, especialmente en SCA7. En este subtipo, los niños afectados pueden presentar formas severas de inicio temprano y fallecer antes de que el padre o abuelo que les transmitió la enfermedad manifieste síntomas. Asimismo, las TR, pueden exhibir inestabilidad a lo largo de las divisiones celulares somáticas generando que las células de algunos tejidos contengan números variables de repeticiones del alelo expandido (8,13).

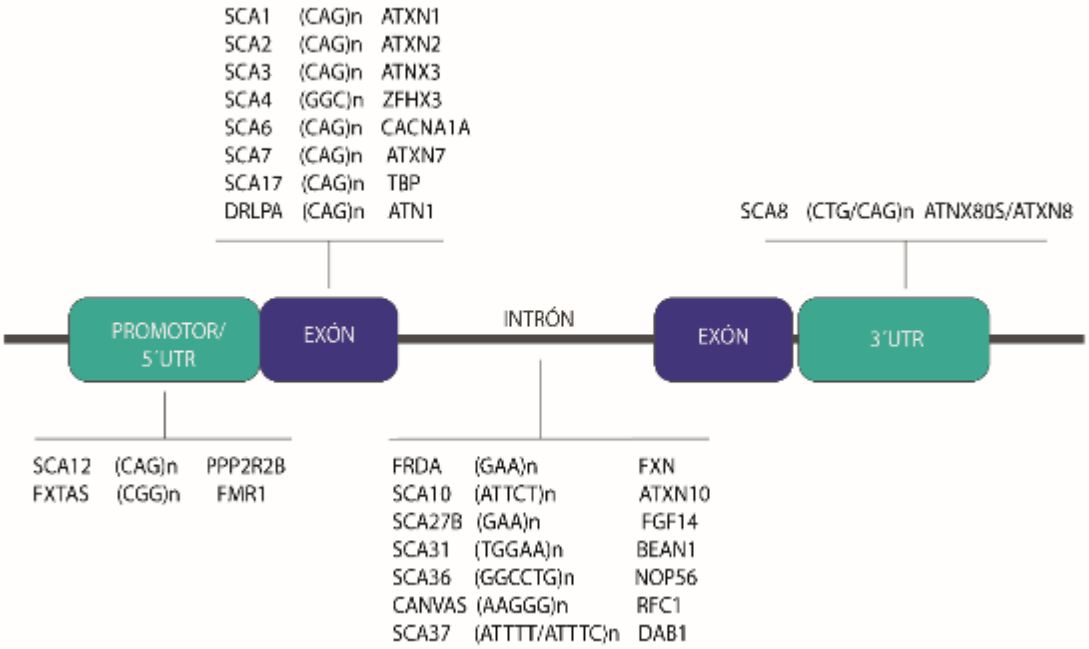


Figura 1. Localización de las expansiones repetidas en tándem (TR) dentro de los genes asociadas con diferentes tipos de ataxias hereditarias. Las expansiones de TR pueden afectar las regiones codificantes (principalmente codificando tramos de poliglutamina) o regiones no codificantes de los genes. Las expansiones TR no codificantes se encuentran principalmente en regiones promotoras o regiones no traducidas en 5′ (UTRs) o intrones y su impacto puede variar desde la alteración de la expresión génica hasta la formación de agregados celulares y nucleares que contribuyen a la patogénesis de estas enfermedades. **CANVAS**: síndrome de ataxia cerebelosa, neuropatía y arreflexia vestibular; **DRPLA**: atrofia dentatorubro-palidoluisiana; **AF**: ataxia de Friedreich; **FXTAS**: síndrome de temblor atáxico asociado a X frágil; **SCA**: ataxia espinocerebelosa. [Imagen adaptada de (16)]

Sumando complejidad a estas variantes genéticas, en años recientes se han identificado secuencias interruptoras de repeticiones, las cuales parecen desempeñar un papel estabilizador en las expansiones o modificar el fenotipo de los pacientes. Se han observado, por ejemplo, fenotipos menos severos en comparación con las expansiones no interrumpidas en casos de SCA2 (17). En SCA 10 se ha propuesto que los pacientes afectados que presentan interrupciones ATCCT en el fragmento repetitivo ATTCT del gen *ATXN10* tienen una mayor probabilidad de experimentar epilepsia, además de los síntomas característicos de las ataxias (18).

Las variantes de nucleótido simple (SNV), también conocidas como variantes puntuales, son cambios en uno o pocos nucleótidos del ADN que pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos codificados por el gen. Estas variantes, producen diversos resultados según su ubicación en la región codificante de un gen. Las variantes silenciosas o sinónimas (*silent*) no afectan la función de la

proteína, ya que cambian un codón por otro que aún codifica el mismo aminoácido. En contraste, las variantes de cambio de sentido (*missense*) alteran el codón que, al codificar un aminoácido diferente, posiblemente afecte la función de la proteína. Por otro lado, las variantes sin sentido (*nonsense*) reemplazan un codón por uno de los tres codones de terminación, resultando en la formación de un polipéptido prematuramente truncado y frecuentemente generan proteínas no funcionales. La gravedad de los efectos depende del contexto del aminoácido en la proteína madura normal, su función y las características químicas de los aminoácidos involucrados en el intercambio. Además, estas variantes pueden afectar los sitios de empalme (*splicing*) del ARNm, pudiendo impactar en su maduración y en consecuencia en la expresión del gen.

Las deleciones o inserciones en el ADN, conocidas como InDels, provocan un cambio en el número total de nucleótidos en un genoma, lo que puede dar lugar a un desplazamiento o alteración del marco de lectura (*frameshift*) durante la traducción. Esto resulta en cambios significativos en la secuencia de aminoácidos de la proteína, pudiendo inducir la aparición de codones de terminación prematuro. Estos eventos afectan la funcionalidad de la proteína y pueden dar lugar a manifestaciones clínicas de la enfermedad (11).

Las variantes en el número de copias (CNV) son variantes estructurales en las que segmentos del genoma cuyo tamaño oscila entre 1000 y millones de pares de bases (pb) pueden variar en número de copias (11). Si bien en los últimos años se han identificado este tipo de variante genética en pacientes afectados por AH (19), los CNV siguen siendo la causa subyacente menos frecuente de estos trastornos.

La comprensión de estos diversos mecanismos mutacionales es fundamental para el diagnóstico preciso y en consecuencia, para el asesoramiento genético adecuado y el desarrollo de terapias dirigidas en las AH. Cada tipo de mutación puede requerir diferentes estrategias de detección y manejo, lo que subraya la importancia de una caracterización genética detallada en estos trastornos.

1.7. Abordaje diagnóstico

El abordaje diagnóstico de las AH generalmente se divide en dos etapas principales:

1. Examen clínico exhaustivo: Incluye historia médica, exploración física, evaluación neurológica, neuroimagen y análisis detallado de antecedentes familiares.
2. Pruebas genéticas moleculares confirmatorias: Se realizan para identificar la variante genética responsable de la ataxia.

1.7.1. Examen clínico

El examen clínico comprende los siguientes pasos:

Historia clínica: Se lleva a cabo una exhaustiva anamnesis del paciente con el propósito de recabar información detallada sobre varios aspectos relevantes, incluyendo la historia familiar, el desarrollo psicomotor, los primeros síntomas y manifestaciones, la instauración y evolución de los síntomas, otras manifestaciones neurológicas y el consumo de sustancias. La historia clínica es crucial en la identificación de factores de riesgo genéticos y en la exclusión de causas secundarias.

Examen físico y pruebas neurológicas: Se realiza un examen físico completo, prestando especial atención a la coordinación motora, el equilibrio, la marcha y la fuerza muscular.

Se pueden realizar diversas pruebas neurológicas para evaluar la función cerebelosa y el sistema nervioso en general. Estas pruebas pueden incluir la evaluación del reflejo de marcha, la prueba del dedo-nariz, la prueba del talón-rodilla, entre otras (20,21).

Durante el examen neurológico se utilizan diversas escalas y pruebas para evaluar la severidad y el impacto funcional de las ataxias. Estas escalas proporcionan una medición objetiva de la disfunción del movimiento y la coordinación, lo que ayuda en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes. La escala de ataxia de SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia) (22) es de las escalas más utilizadas en este campo. Esta escala se utiliza para evaluar la severidad de la ataxia y se enfoca en la marcha, la postura, los movimientos de las extremidades superiores e inferiores y la coordinación de los movimientos oculares. La puntuación total varía de 0 a 40, donde una puntuación más alta indica una mayor discapacidad.

Estudios de neuroimágenes: Los estudios de resonancia magnética (RM) del cerebro y la médula espinal son fundamentales para descartar otras causas de ataxia y para identificar cambios estructurales que puedan estar relacionados con ciertos subtipos de AH (21,23).

Además, se pueden realizar estudios complementarios, como análisis de biomarcadores en laboratorio y evaluaciones neurooftalmológicas.

1.7.2. Diagnóstico Genético-Molecular

El diagnóstico genético-molecular es crucial para confirmar la causa específica de la AH y proporcionar información precisa sobre el pronóstico y las opciones de manejo. Debido a la gran superposición clínica entre las diversas formas de AH, resulta desafiante establecer un diagnóstico preciso en individuos con sospecha de esta afección sin la realización de pruebas genéticas-moleculares. Aunque los hallazgos clínicos pueden ofrecer cierta distinción entre algunas formas de AH, encontrar una causa genética a menudo solidifica el diagnóstico y, en consecuencia, facilita las discusiones sobre pronóstico,tratamiento y asesoramiento genético.

Dada la diversidad de mecanismos mutacionales involucrados, se pueden requerir diferentes pruebas genéticas-moleculares (**Tabla 4**). Idealmente, se debe iniciar con la prueba molecular que permita analizar el subtipo de ataxia que se sospecha, basándose en el patrón hereditario observado en el árbol genealógico (si existe), en los hallazgos de los análisis de laboratorio, en las características clínicas y en los datos epidemiológicos. A continuación, se describen las principales técnicas actualmente utilizadas para el diagnóstico genético-molecular de AH.

1.7.2.1. Análisis de Fragmentos

El análisis de fragmentos es una técnica utilizada para detectar expansiones de TR. Esta técnica implica la amplificación por PCR de la región que contiene las repeticiones, seguida de la separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar. Cuando la causa subyacente de la ataxia es la expansión de TR, el objetivo es identificar el tamaño de la repetición de nucleótidos en cada alelo para establecer el diagnóstico.

En el caso de expansiones de TR menores a 100 repeticiones, como las asociadas con SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, el método más comúnmente utilizado actualmente es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida del análisis de fragmentos (**Figura 2A**). Para la PCR, se utiliza un juego de cebadores (uno de ellos marcado con un fluoróforo) que se unen específicamente a los flancos de la secuencia TR en el gen de interés. Una vez realizada la PCR, los fragmentos amplificados con la repetición de nucleótidos se someten a la electroforesis capilar, permitiendo así, su separación según su tamaño. Durante el análisis de los resultados, se calcula el número de repeticiones a partir del tamaño de los fragmentos obtenidos, lo que facilita la identificación de expansiones de TR en uno o ambos alelos. Para cada individuo y una TR específica, se pueden observar las siguientes situaciones: la presencia de dos fragmentos de diferentes tamaños, indicando que el sujeto es heterocigota y tiene un número de repeticiones distinto en cada alelo (**Figura 2A**); o la presencia de un único fragmento, lo que sugiere que el sujeto es homocigota y tiene el mismo número de repeticiones en ambos alelos, o puede indicar que posee un alelo normal y otro expandido que no es detectable mediante esta técnica. Es importante tener en cuenta que esta metodología no proporciona información detallada sobre la secuencia o el número exacto de las repeticiones (24).

En el caso de TR más extensas, como la causante de AF o SCA10, la técnica estándar de PCR puede no ser fiable, ya que no amplifica repeticiones de más de ~100 repeticiones con alto contenido de Guanina y Citosina. Una alternativa ampliamente empleada y que ha sustituido al Southern Blot en la práctica clínica es la PCR de triple repetición (TP-PCR), la cual utiliza tres cebadores para amplificar las expansiones de mayor tamaño, de los cuales: uno es fluorescente (C1) y específico para la región flanqueante (aguas arriba) de la TR de interés, el segundo cebador (C2) está formado por la secuencia complementaria a las repeticiones y se continúa hacia el extremo 5´ con una secuencia que no está presente en el genoma humano y un tercer cebador (C3), denominado

universal, que es complementario de la secuencia que no está presente en el genoma humano, que forma parte del C2. C3 se utiliza como anclaje para impedir el acortamiento progresivo de los productos de PCR durante los ciclos posteriores. Se producen, en consecuencia, amplicones de diferentes tamaños, los cuales se separan por tamaño haciendo uso de la electroforesis capilar. Cuando al menos un alelo expandido está presente en la muestra se observa en un patrón específico de "escalera" o "diente de peine (**Figura 2B**). La TP-PCR permite detectar expansiones de más de 100 repeticiones, aunque no permite la cuantificación ni la diferenciación entre los alelos. Por lo tanto, suele complementarse con una PCR adicional para evaluar la presencia de alelos no expandidos en los casos que se requiera distinguir un heterocigota de un homocigota (25,26).

Estas técnicas de análisis molecular son fundamentales para el diagnóstico preciso de las AH, permitiendo la identificación de expansiones de repeticiones en tándem que son responsables de muchos subtipos de estas enfermedades. La elección de la técnica adecuada depende del tipo y tamaño de la expansión sospechada, lo que subraya la importancia de un enfoque diagnóstico personalizado en las AH.

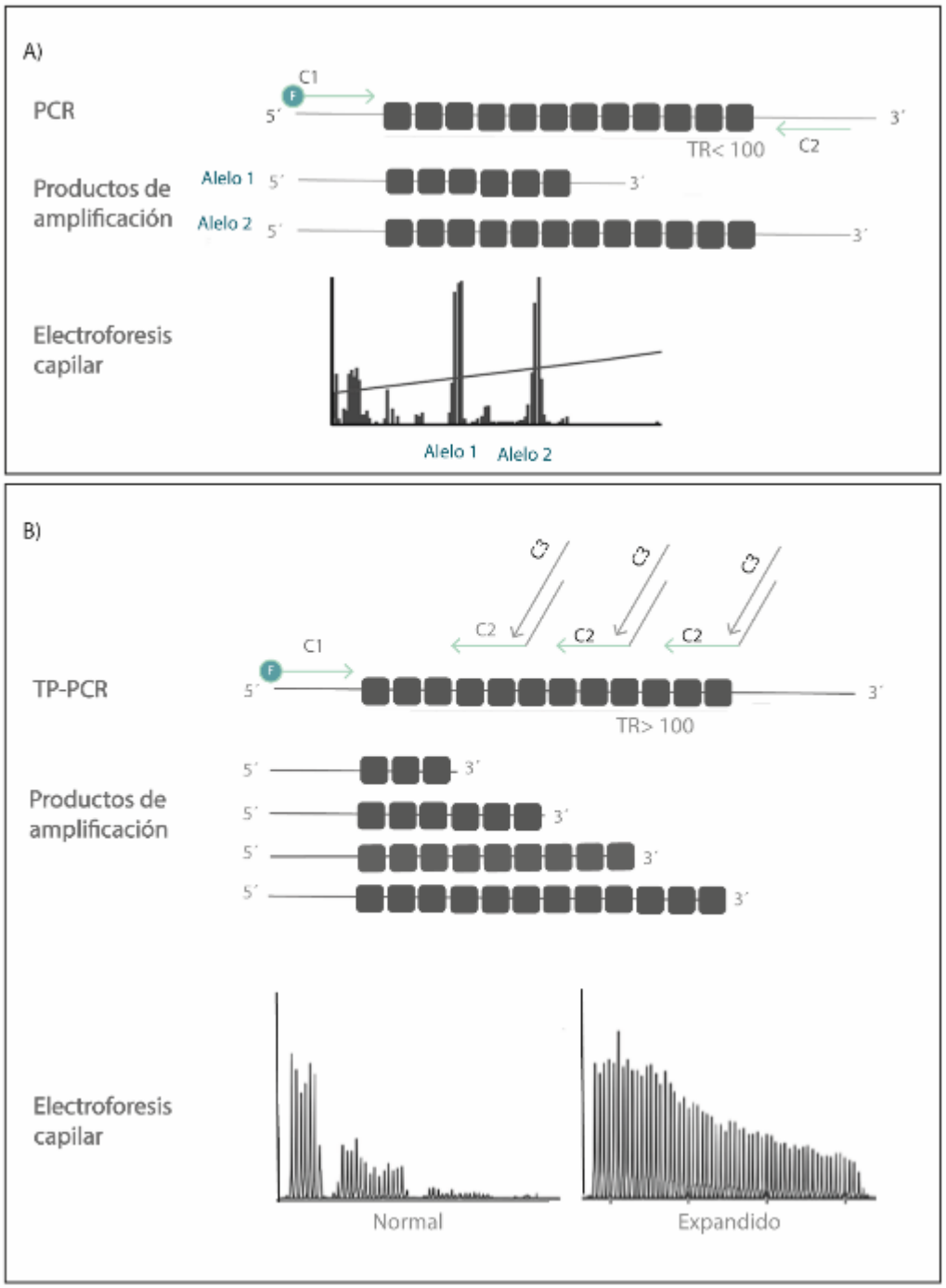


Figura 2. Esquema del enfoque de análisis de fragmentos para la detección de expansiones de repeticiones en tándem (TR). A. *Proceso de PCR fluorescente convencional con cebadores que flanquean las repeticiones, seguido de electroforesis capilar. Las cajas sombreadas representan las repeticiones en la secuencia de ADN (por ejemplo, CAG). Los cebadores (C1 y C2) amplifican la secuencia repetitiva, generando amplicones de diferente tamaño para cada alelo. Los fragmentos son separados por tamaño mediante electroforesis capilar.* ***B.*** *Principio de la TP-PCR. Las cajas sombreadas nuevamente representan las repeticiones en la secuencia amplificada de cada alelo (por ejemplo, CAA). Durante los primeros ciclos de amplificación, el cebador C2 se une a múltiples sitios a lo largo de las repeticiones CAA, resultando en una*

mezcla de productos de diferentes tamaños que se separan mediante electroforesis capilar, mostrando un perfil similar al de un peine. ***F****: Fluoróforo en la posición 5´ del cebador. [Figura adaptada de (25,26)].*

1.7.3. Secuenciación de primera generación.

La secuenciación de Sanger, desarrollada en 1977 por Frederick Sanger, es una técnica de secuenciación de ADN ampliamente utilizada en la investigación y el diagnóstico genético, incluyendo el diagnóstico de AH. Se caracteriza por su alta precisión en la determinación de secuencias de ADN cortas (menores a 800 pb) y es eficaz para identificar variantes de secuencia en el ADN (SNVs e InDels), aunque no permite detectar expansiones de TR. Tiene un costo relativamente bajo, pero no es tan fácilmente escalable para secuenciar múltiples genes o muestras simultáneamente como algunas tecnologías de secuenciación masiva (**Figura 3, Tabla 4**). Es por ello que se utiliza cuando el fenotipo y la historia familiar orientan hacia algún subtipo particular de ataxia.

Esta metodología, conocida como secuenciación de terminación de cadena, requiere inicialmente la amplificación por PCR de la región del ADN a estudiar. Posteriormente, la secuenciación procede mediante la síntesis de una cadena complementaria de ADN a partir del producto de PCR. Para ello, se emplean la ADN polimerasa, un cebador, desoxinucleótidos (dNTPs) y dideoxinucleótidos (ddNTPs), siendo estos últimos componentes clave de esta técnica. Los ddNTPs, versiones modificadas de los nucleótidos que carecen del grupo 3'-OH, el cual es necesario para la adición de nuevos nucleótidos a la cadena en crecimiento. Cuando se incorpora un ddNTP, la cadena de ADN se detiene en esa posición específica. La incorporación de ddNTP es aleatoria, produciendo fragmentos de longitud variable. Posteriormente, la separación por tamaño mediante electroforesis capilar revela la disposición de los nucleótidos en función del lugar donde se terminó el fragmento. La fluorescencia específica de cada ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) permite leer y reconstruir la secuencia. Finalmente, la secuencia obtenida se compara con la secuencia de referencia del gen o la secuencia estudiada para identificar posibles variantes genéticas responsables de la AH (11).

1.7.4. Secuenciación de segunda generación

Aunque la secuenciación de Sanger se considera la técnica de referencia para detectar SNVs y pequeños InDels en genes específicos, presenta limitaciones en la identificación de variantes más complejas o en la secuenciación de regiones más extensas del genoma. En la práctica clínica actual, existe una creciente preferencia por los enfoques de secuenciación de nueva generación en el diagnóstico genético. La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), también conocida como secuenciación de segunda generación o secuenciación masiva en paralelo, ha

revolucionado el campo del diagnóstico genético. Esta tecnología permite la secuenciación simultánea de múltiples fragmentos de ADN, lo que resulta en ahorros significativos en tiempo y costos por base secuenciada (**Figura 3, Tabla 4**). Al igual que la secuenciación de Sanger, NGS permite identificar SNVs e InDels.

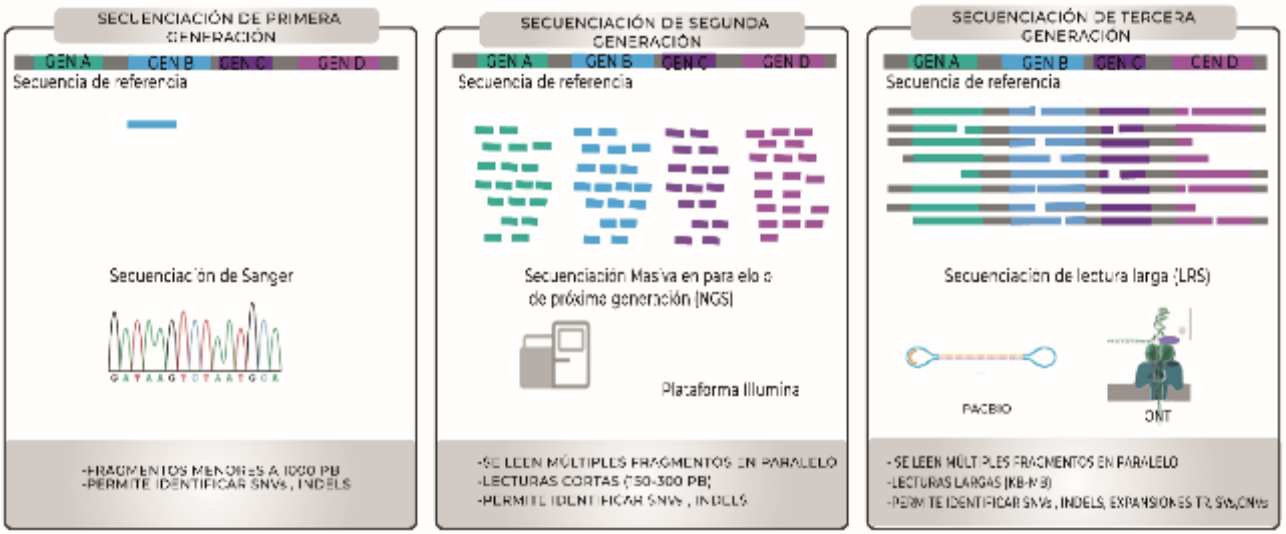


Figura 3. Comparación entre las tres generaciones de secuenciación de ADN. *La primera generación es capaz de leer una o pocas regiones específicas del ADN. En contraste, la secuenciación de segunda y tercera generación permiten la lectura simultánea de múltiples regiones del ADN. La diferencia principal entre estas últimas radica en la longitud de la lectura: en la secuenciación de nueva generación (NGS), las lecturas son cortas (150-300 pb), mientras que en la secuenciación de lecturas largas (LRS), las lecturas son considerablemente más largas de varios Kb.* ***ONT****: Tecnología de Oxford Nanopore.*

Estas tecnologías, que emergieron en la década de 2000, han ampliado significativamente la capacidad para examinar la variación genética. Han posibilitado la identificación de nuevos genes causantes de enfermedades genéticas y han demostrado superar varias limitaciones inherentes a la secuenciación de primera generación. La capacidad de estudiar múltiples regiones del genoma simultáneamente en corto tiempo ha contribuido significativamente a la obtención de diagnósticos genéticos en un mayor número de pacientes, y le otorga a estas tecnologías, un enorme potencial de aplicación en el estudio de trastornos genéticamente heterogéneos, como son las AH no causas por expansión de TR (27,28).

Se distinguen tres estrategias principales de NGS aplicadas al diagnóstico genético, incluyendo el de las AH: la secuenciación dirigida (TS, *Targeted Sequencing*) a través de paneles de genes, la secuenciación del exoma completa (WES, *Whole Exome Sequencing*) y la secuenciación del genoma completo (WGS, *Whole Genome Sequencing*).TS se enfoca en la secuencia codificante

de un conjunto específico de genes seleccionados por su relevancia para la patología bajo estudio. Esta técnica es ampliamente empleada en el ámbito clínico y a menudo se le conoce también como exoma clínico. WES se centra en la región codificante de todos los exones de un organismo, que representa aproximadamente el 1% del genoma humano. Esta estrategia no estudia las variantes observadas en regiones no codificantes que pueden tener funciones regulatorias. Por último, WGS secuencia casi todos los nucleótidos del genoma, incluyendo el ADN cromosómico y mitocondrial. Es particularmente útil cuando se sospecha una enfermedad genética y no se ha identificado ninguna variante genética específica mediante otras pruebas moleculares, pero es una estrategia es más costosa y conlleva una mayor complejidad en el procesamiento, almacenamiento e interpretación de los datos generados (11,27).

NGS ha experimentado una notable evolución desde la introducción y comercialización de las primeras tecnologías en 2005. Actualmente, diversas plataformas están disponibles comercialmente y se utilizan en el diagnóstico clínico. Entre ellas, las metodologías de Ion Torrent e Illumina destacan como las más eficientes, siendo esta última la más ampliamente utilizada en la práctica clínica actual dada la alta precisión (superior al 99,9%) (29).

Aunque varían en su química, todas las metodologías de NGS comparten la capacidad de secuenciar múltiples fragmentos de ADN simultáneamente en un breve lapso de tiempo. Además, siguen un enfoque metodológico similar, que se centra en la construcción, secuenciación y análisis de lo que se conoce como "librería de secuenciación" (**Figura 4**). Este proceso puede resumirse en los siguientes pasos:

1. Fragmentación del ADN. Se fragmenta el ADN en segmentos cortos, generalmente de 150-300 pb. La fragmentación puede realizarse mediante métodos mecánicos, digestión enzimática u otros, dependiendo de la tecnología utilizada. En el caso de paneles y secuenciación de exoma, se capturan los segmentos cortos relevantes para las secuencias de ADN objetivo mediante sondas complementarias específicas.
2. Marcaje del ADN. Cada muestra de ADN se etiqueta con un índice específico, facilitando la identificación del paciente. Este proceso también permite la adición de adaptadores de secuenciación a los segmentos de ADN, posibilitando la secuenciación paralela masiva posterior.
3. Amplificación. Los fragmentos de ADN marcados con adaptadores se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Secuenciación. La librería de secuenciación se carga en una matriz o celdas de secuenciación en un secuenciador específico. Aunque diferentes secuenciadores utilizan distintas matrices (por ejemplo, celdas de flujo en Illumina o chips de secuenciación en Ion Torrent), el objetivo es el mismo: permitir la secuenciación paralela masiva de todos los segmentos de ADN simultáneamente.

5. Análisis bioinformático: incluye el ensamble y el alineamiento de lecturas, el llamado (identificación) y anotación (caracterización) de variantes. Durante este proceso, se compara la información de la secuencia con una secuencia de referencia del genoma humano para identificar posibles variantes genéticas en las secuencias seleccionadas.

6. Interpretación de resultados: A partir del archivo generado en el análisis bioinformático, las variantes genéticas se filtran y priorizan considerando parámetros como frecuencia poblacional, predictores de patogenicidad y genes asociados a la patología bajo estudio. El objetivo es identificar la importancia biológica o clínica de las variantes para así identificar la o las variantes genéticas causantes de la enfermedad.

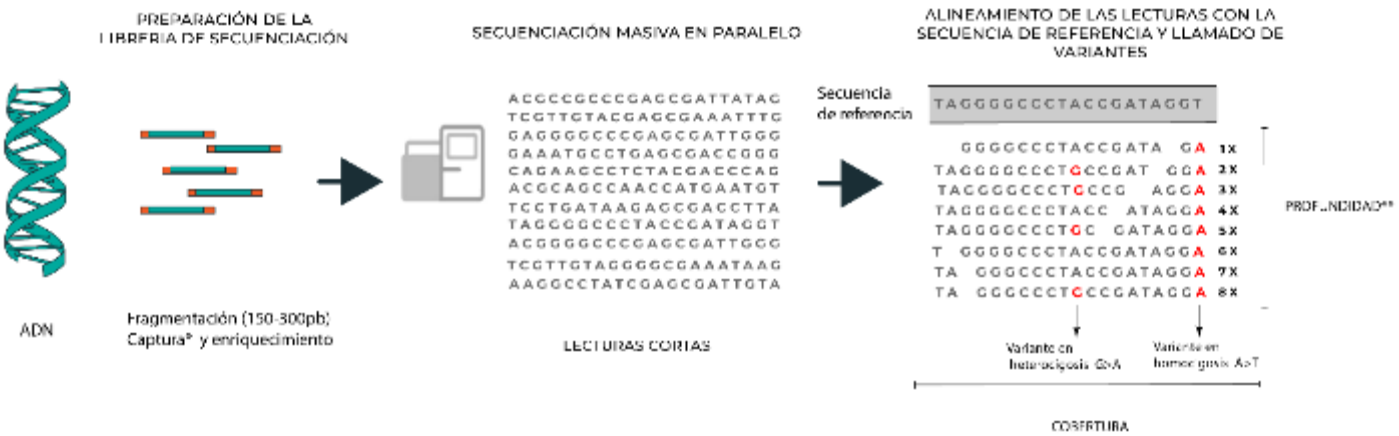


**Figura 4. Principio básico y flujo de trabajo en Secuenciación de Nueva Generación (NGS). ***Los pasos de enriquecimiento del objetivo ("captura") solo son necesarios cuando no se analiza todo el genoma, por ejemplo, en la secuenciación dirigida de genes seleccionados o en la secuenciación del exoma completo, donde solo se analizan los segmentos codificantes de proteínas (exones) ** o cobertura vertical. pb: pares de bases. [Imagen adaptada de(27)].

La secuenciación Ion Torrent y la plataforma de Illumina, como se mencionó anteriormente, son dos tecnologías líderes en el campo de la secuenciación de nueva generación. Al igual que otras tecnologías, siguen el proceso de construcción y secuenciación de librerías descrito, pero presentan diferencias distintivas en su química subyacente.

En el caso de la secuenciación Ion Torrent, se utiliza una emulsión de perlas, donde cada perla contiene una sola molécula de ADN fragmentado. Este ADN fragmentado se emulsiona en gotas de agua en aceite, lo que crea un gran número de pequeñas reacciones de PCR en emulsión. Después de la PCR en emulsión, las perlas se transfieren a un chip que contiene millones de micropozos, donde cada pozo contiene una sola perla. En este punto, se agrega una solución que contiene los cuatro nucleótidos (A, T, C y G) uno por uno. Cuando un nucleótido se incorpora en el proceso de síntesis de ADN, se libera un ion H+ (ion hidrógeno). Este ion H+ se detecta como un cambio en el pH del medio. Estos cambios de pH se registran como señales eléctricas y se utilizan para determinar la secuencia de nucleótidos (30).

En contraste, la secuenciación a través de la plataforma de Illumina es un método de secuenciación por terminación cíclica reversible que se basa en la utilización de nucleótidos marcados con fluoróforos en una reacción de síntesis de ADN. Una vez que la librería de secuenciación se coloca en la celda de flujo, los fragmentos de ADN se amplifican mediante el método de PCR en puente sobre la celda de flujo para la generación de los clústeres (colonias del mismo fragmento). Este paso es importante para obtener suficiente señal para la detección durante la secuenciación. Durante este proceso, cada vez que se incorpora uno de estos nucleótidos a la cadena, el sistema captura y registra el tipo de nucleótido en base a la fluorescencia emitida. Después de la captura, se eliminan los fluoróforos de los nucleótidos incorporados y se continúa la síntesis de la cadena con nuevos nucleótidos marcados. Además, esta tecnología se caracteriza por ser de tipo "paired-end", es decir que permite secuenciar ambos extremos de los fragmentos, lo que proporciona información complementaria y aumenta la calidad de los datos de la secuenciación (30).

Un parámetro básico para determinar la calidad técnica de la secuenciación es el número de secuencias leídas en una cierta posición de base de nucleótidos (profundidad de secuenciación o cobertura vertical). Una mayor profundidad de secuenciación aumenta la confianza de que el resultado es real y no un artefacto (llamada de falso positivo). La profundidad de secuenciación mínima recomendada depende del tipo de variante a identificar, de la plataforma tecnológica utilizada y de otros parámetros de calidad de secuenciación (27). Las pautas publicadas en 2013 recomendaron profundidades mínimas de 10 a 20 secuencias en cada nucleótido al buscar variantes germinales heterocigotas (31), pero las plataformas actuales alcanzan profundidades de secuenciación considerablemente mayores. Por ejemplo, para el diagnóstico molecular mediante

WES, la profundidad de cobertura estándar suele ser de 100X, para WGS de 30X, y para TS oscila generalmente entre 100X y 500X. En caso de identificarse variantes con una profundidad de cobertura insuficiente, es necesario llevar a cabo una validación adicional mediante otra metodología, como la secuenciación por Sanger, con el fin de garantizar la precisión del diagnóstico. Otro parámetro básico es la cobertura horizontal, definida como el porcentaje del área genómica examinada que ha sido analizada con una profundidad de secuenciación suficiente. Cuando la cobertura no es suficiente, existe la probabilidad de que la variante diagnóstica se encuentre en zonas no leídas. En este caso, se puede considerar la búsqueda de estas variantes utilizando otras metodologías (27).

La secuenciación de nueva generación ha sido fundamental para aumentar el número de diagnósticos en los pacientes afectados por AH, con un rédito diagnóstico aproximado del 43% (32). Además, ha contribuido significativamente a aumentar el conocimiento de la genética estos trastornos, facilitando la identificación de nuevos genes y ampliando el espectro de subtipos clínicos asociados. En los últimos años, las tecnologías de NGS que permiten el cribado de grandes cohortes de pacientes han posibilitado la detección de nuevas variantes en genes de ataxia conocidos y han ayudado a definir la prevalencia mundial de variantes genéticas que inicialmente se consideraban limitadas a poblaciones específicas (28).

A pesar de sus evidentes ventajas, la tecnología de NGS presenta limitaciones técnicas relacionadas con los procedimientos de amplificación de PCR, la captura selectiva de regiones objetivo y la cobertura. Estas cuestiones, junto con las limitaciones inherentes de las lecturas cortas, impiden la detección de variantes como SVs (variantes estructurales), CNVs (variantes en el número de copias), expansiones de TR y mutaciones en regiones intrónicas complejas. Aunque se han desarrollado nuevos herramientas o algoritmos para el análisis bioinformático de estas variantes mediante WGS, esta técnica sigue estando más restringida a actividades de investigación debido a su cobertura relativamente baja y los costos más elevados involucrados. Por otra parte, estas tecnologías presentan dificultades técnicas asociadas con el análisis de resultados, ya que el manejo del gran volumen de datos generado requiere conocimiento en técnicas bioinformáticas y una infraestructura computacional adecuada para la interpretación de los resultados (28).

En conclusión, la secuenciación de nueva generación ha revolucionado el diagnóstico genético de las AH, aumentando significativamente el rédito diagnóstico y el conocimiento sobre estos trastornos. Sin embargo, presenta limitaciones técnicas, especialmente en la detección de ciertas variantes genéticas y en el manejo e interpretación de grandes volúmenes de datos. Estas limitaciones subrayan la importancia de continuar desarrollando nuevas tecnologías y estrategias de análisis en el campo de la genética de las AH.

1.7.5. Secuenciación de tercera generación

Como se mencionó en la sección anterior, a pesar del creciente número de genes y variantes descubiertos en AH a partir de la utilización de las técnicas de NGS(28), estas metodologías presentan limitaciones intrínsecas, principalmente debido a su capacidad para secuenciar solo fragmentos de longitud de lectura corta (150-300 pb). Las variantes estructurales (VSs), los elementos repetitivos, el contenido extremo de Guanina-Citosina (GC) o las secuencias con múltiples elementos homólogos en el genoma son difíciles de caracterizar mediante NGS, incluso con el uso de algoritmos bioinformáticos de última generación (33).

La secuenciación de tercera generación, también conocida como secuenciación de lecturas largas (LRS, Long Read Sequencing), representa un avance significativo en las tecnologías de secuenciación genómica. Desarrollada para superar las limitaciones inherentes de las tecnologías de segunda generación, LRS ofrece la capacidad de generar secuencias continuas desde 10 kilobases (Kb) hasta varios megabases (Mb) de longitud directamente a partir de ADN nativo (33) (**Figura 3, Tabla 4**). Junto con los desarrollos recientes en rendimiento y precisión, LRS ha aumentado sustancialmente su utilidad y aplicación. Esta tecnología, introducida por Pacific Biosciences (PacBio) y Oxford Nanopore Technologies (ONT) en 2011, ofrece una alternativa prometedora a las técnicas de NGS convencionales. Ambas plataformas son capaces de generar lecturas que pueden atravesar fácilmente las regiones más repetitivas del genoma humano. Sin embargo, presentan diferencias en su química y enfoques de detección de secuencia que inciden en aspectos como la longitud de lectura, precisión y rendimiento por cada una (29,33).

Tabla 4. Resumen comparativo de las técnicas de diagnóstico Genético-Molecular utilizadas en el estudio de ataxias hereditarias (AH), centrándose en aspectos como la técnica empleada, el alcance de cada técnica, su uso en el diagnóstico de AH y las limitaciones asociadas. Ec: *electroforesis capilar**. TR:*** *repetición en tándem.* ***SCA:*** *Ataxia Espinocerebelosa.**AF:*** *Ataxia de Friedreich*

Técnica		Alcance	Uso en el diagnóstico de AH	Limitaciones
Análisis de Fragmentos	**PCR Fluorescente + EC**	- Identifica el tamaño de repeticiones de nucleótidos en expansiones de TR	- Útil para expansiones de TR en genes específicos como los asociados a SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7	- No proporciona información sobre la secuencia exacta de expansiones TR - No es útil con expansiones TR mayores a 1000 pb
	TP-PCR + EC	- Identifica grandes expansiones de TR	- Útil para expansiones de TR grandes como las causantes de AF, SCA10, SCA36	- No permite cuantificar el número de TR - No diferencia entre homocigotas o heterocigotas para la expansión de TR - no proporciona información sobre la secuencia - En algunos casos debe complementarse con PCR Long range o PCR fluorescente +EC
Secuenciación de primera generación		- Secuencia corta longitud (<800 pb) - Detecta variantes puntuales e InDels - Útil para estudios de segregación familiar o confirmación de variantes.	- Útil cuando fenotipo y antecedentes orientan hacia subtipo específico de AH - Precisa para identificar SNVs e InDels a un costo bajo por base	- No detecta expansiones de TR - No es escalable para secuenciar múltiples genes o muestras simultáneamente
Secuenciación de segunda generación (NGS)		- Secuencia múltiples regiones simultáneamente - Detecta SNVs e InDels	- Amplio uso en la práctica clínica, - Útil para identificar nuevas variantes en genes asociados a ataxia	- Limitado para identificar variantes más complejas como SVs, CNVs y expansiones de TR - Requiere de algoritmos bioinformáticos para analizar e interpretar resultados
Secuenciación de tercera generación (LRS)		- Genera secuencias continuas de 10 Kb a varios Mb - Detecta SNVs, SVs, CNVs, expansiones TR, y bases modificadas	- Útil para caracterizar expansiones TR - Detecta diferentes tipos de variantes en una única corrida.	- Costo más alto en comparación con otras técnicas - Menor precisión que técnicas de NGS - Requiere de algoritmos bioinformáticos para analizar e interpretar resultados - Por el momento uso restringido en investigación

La plataforma PacBio está basada en la secuenciación por síntesis y utiliza la tecnología de molécula única en tiempo real (SMRT, *Single-molecule real-time*) (**Figura 5A**). Durante la preparación de la librería de secuenciación, no se requiere amplificar el ADN por PCR, ya que esta tecnología utiliza una plantilla SMRTbell. SMRTbell, es un ADN circular cerrado de simple cadena (ADNsc) que se crea mediante la ligación de adaptadores de horquilla en ambos extremos de una molécula de ADN de doble cadena (ADNdc) objetivo. El ADN objetivo puede tener una longitud que varía desde uno hasta más de cien Kb, lo que permite generar lecturas de secuenciación largas. Esta molécula se coloca en un chip llamado celda SMRT, donde entra en unas unidades de secuenciación llamadas guías de onda de modo cero (ZMW). En cada ZMW, hay una sola polimerasa inmovilizada en el fondo, que puede unirse a cualquiera de los adaptadores de la SMRTbell y comenzar la replicación. Se incorporan nucleótidos fluorescentes en la celda SMRT y cada vez que la polimerasa agrega un nucleótido a la cadena de ADN, se genera un pulso de luz. La duración y el color de este pulso de luz son capturados en tiempo real por un sistema de cámaras en cada ZMV y se interpretan para obtener la secuencia de ADN. Esta capacidad de registro en tiempo real permite detectar variaciones en la cinética de los pulsos de luz, lo que facilita la detección de modificaciones en las bases, como la metilación. Debido a que el SMRTbell forma un círculo cerrado, después de que la polimerasa replica una cadena del ADNdc objetivo, puede continuar incorporando bases del adaptador y luego la otra cadena. Si la vida útil de la polimerasa es lo suficientemente larga, ambas cadenas pueden ser secuenciadas múltiples veces (llamadas "pasadas") en una sola CLR (*Continuous long reads*). En este escenario, la CLR puede dividirse en múltiples lecturas (llamadas sublecturas) reconociendo y cortando las secuencias de adaptador. La secuencia de consenso de múltiples sublecturas en un solo ZMW produce una lectura de secuencia de consenso circular (CCS, circular consensus sequencing) de mayor precisión (33,34).

Por otro lado, la tecnología de secuenciación por nanoporos (ONT) utiliza moléculas de ADN lineales en lugar de circulares (**Figura 5B**). Estas moléculas de ADN lineales suelen tener una longitud de uno a varios cientos de kilobases, pero pueden llegar a ser de varios megabases de longitud. La secuenciación de ONT comienza primero mediante la unión de una molécula de ADN de doble cadena a un adaptador de secuenciación, que está pre-cargado con una proteína motora. La mezcla de ADN se carga en una celda de flujo, que contiene cientos a miles de nanoporos incrustados en una membrana sintética. La proteína motora desenrolla el ADN de doble cadena y, junto con una corriente eléctrica, impulsa el ADN de carga negativa a través del poro a una velocidad controlada. A medida que el ADN atraviesa el poro, causa interrupciones características en la corriente, que se analizan en tiempo real para determinar la secuencia de las bases en la cadena de ADN. Las longitudes de lectura de ONT pueden superar las de PacBio en al menos un orden de

magnitud, llegando a generar lecturas de más de 1 Mb de longitud. La lectura más larga reportada se acerca a los 2.3 Mb de longitud cuando se ensamblan computacionalmente a partir de lecturas más cortas. En la actualidad, existen tres secuenciadores disponibles comercialmente: MinION, GridION y PromethION. Estas plataformas varían en su capacidad de celdas de flujo, con el MinION que puede contener una, el GridION hasta cinco, y el PromethION capaz de generar datos simultáneamente a partir de hasta 48 celdas de flujo. Además, ONT ofrece el Flongle para aplicaciones de bajo rendimiento, compatible con MinION y GridION, lo que permite realizar pruebas más pequeñas, frecuentes y rápidas a una fracción del costo de las celdas de flujo tradicionales. Las ventajas en cuanto a tamaño y portabilidad de estas plataformas son evidentes en el caso del MinION, que puede transportarse fácilmente y utilizarse en casi cualquier lugar con una conexión a una computadora. Esto es especialmente beneficioso para aplicaciones en entornos de campo donde el acceso a un laboratorio tradicional puede ser limitado o impracticable. Además, la capacidad de secuenciación en tiempo real del MinION permite un análisis rápido de muestras, lo que es crucial en situaciones que requieren resultados rápidos como en entornos clínicos (29).

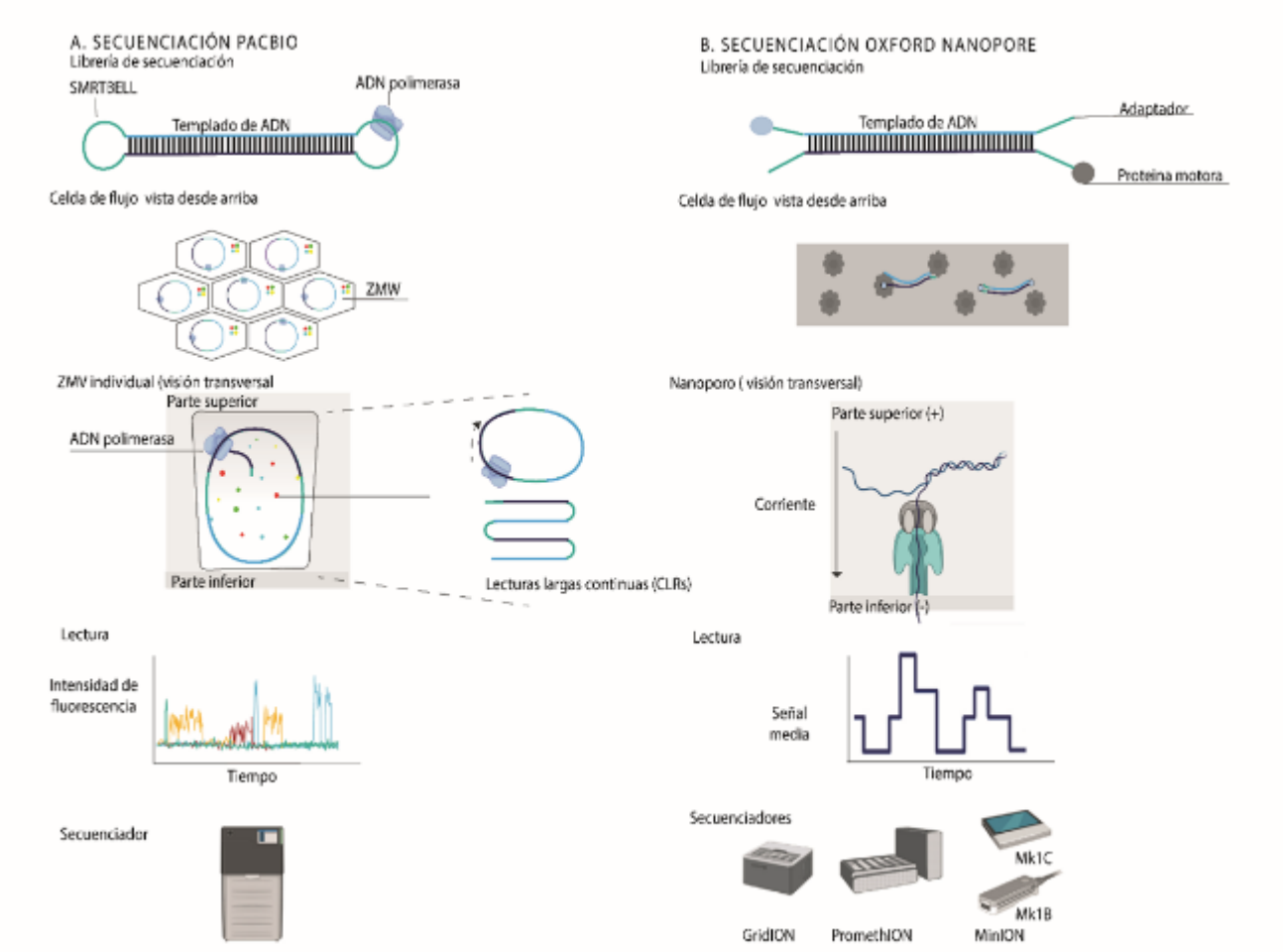


Figura 5 Resumen de las tecnologías de secuenciación de lecturas largas. A. En la secuenciación de molécula única en tiempo real (SMRT) de Pacific Biosciences (PacBio), el ADN se fragmenta y se liga a adaptadores en forma de horquilla para formar una molécula circular conocida como SMRTbell. Este SMRTbell se une a una polimerasa de ADN y se carga en una celda SMRT para la secuenciación. Cada celda SMRT puede contener hasta 8 millones de guías de onda de modo cero (ZMW), que son cámaras que contienen volúmenes picolitros. La secuencia de ADN se determina mediante la emisión fluorescente que se registra en cada ZMW, con un color diferente correspondiente a cada base de ADN. La morfología circular característica de la SMRTbell permite que esta plataforma pueda generar lecturas continuas largas (CLRs). **B.** En la secuenciación de Oxford Nanopore Technologies (ONT), el ADN se etiqueta con adaptadores de secuenciación precargados con una proteína motora en uno o ambos extremos. El ADN se combina con proteínas de anclaje y se carga en la celda de flujo para la secuenciación. La celda de flujo contiene miles de nanoporos proteicos incrustados en una membrana sintética, y las proteínas de anclaje llevan las moléculas de ADN hacia estos nanoporos. Cuando el ADN se mueve a través del nanoporo, causa interrupciones características en la corriente eléctrica, que se utilizan para identificar la secuencia de ADN. [Imagen adaptada de (29)].

Desde su lanzamiento, ONT ha realizado importantes innovaciones en la secuenciación de lecturas largas. Uno de sus últimos y más notables avances es la introducción del muestreo adaptativo (*adaptive sampling*), también conocido como secuenciación selectiva, una técnica de enriquecimiento controlado por software. El muestreo adaptativo representa un salto cualitativo en la eficiencia de la secuenciación. Esta técnica permite:

- Enfocar la secuenciación a regiones específicas de interés sin requerir pasos adicionales de amplificación o hibridación con sondas de captura.
- Mejorar la profundidad de cobertura en áreas relevantes
- Aumentar la eficiencia y reducir costos
- Facilitar la creación de paneles de genes adaptables

Esta técnica aprovecha el análisis en tiempo real de los datos de secuenciación para ajustar dinámicamente los parámetros de secuenciación, centrándose en las regiones de interés. La interfaz de programación "Read Until" permite controlar los poros individuales y solicitar la expulsión de la molécula que se está secuenciando en un poro determinado después de examinar las primeras bases y tomar una decisión sobre si está "en el objetivo". Las moléculas "fuera del objetivo" se expulsan invirtiendo la corriente a través del poro, liberándolo para capturar una nueva molécula. Este enfoque mejora la eficiencia de generación de datos al dirigir los esfuerzos de secuenciación a regiones genómicas específicas, lo que permite una cobertura más profunda y una mejor utilización de los recursos de secuenciación. El muestreo adaptativo tiene el potencial de mejorar la velocidad, precisión y rentabilidad de la secuenciación de lecturas largas, abriendo nuevas posibilidades para su implementación en diversas áreas. Por otro lado, la capacidad del software para seleccionar las regiones a ser secuenciadas facilita la creación de un panel de genes adaptable que puede modificarse según la patología o las características fenotípicas del paciente. Esto marca el camino hacia una medicina más personalizada y precisa, lo cual es especialmente relevante en el estudio de trastornos tan heterogéneos como las AH (35,36).

La capacidad de LRS para abarcar longitudes significativamente mayores (hasta 2 Mb o más) que las técnicas de secuenciación anteriores permite una detección más completa del genoma. Esto posibilita la identificación de un amplio espectro de variantes genéticas, incluyendo SNVs y SVs y CNVs. Además, la LRS facilita la detección de bases modificadas, lo que permite análisis por haplotipo y una comprensión más profunda de la variabilidad genética. Una de las aplicaciones más directas de la LRS es el estudio y caracterización de las expansiones TR (35). Su utilización ha facilitado el descubrimiento de nuevas repeticiones tándem patogénicas, muchas de las cuales no pudieron ser atribuidas con métodos basados en NGS. Por ejemplo, utilizando esta tecnología, se identificó una expansión anormal de pentanucleótidos (TTTCA y TTTTA) en el intrón 4 del gen

SAMD12, lo que resultó en epilepsia mioclónica familiar benigna del adulto (BAFME, MIM:601068) vinculada a 8q24 (37). Al proporcionar una imagen completa de estas expansiones, la LRS también se convierte en una herramienta valiosa para comprender las correlaciones entre las expansiones de TR y los síntomas clínicos. Como se ha mencionado anteriormente, ciertos estudios sugieren que no solo el número de expansiones es significativo, sino también las interrupciones dentro de los TR y el estado de metilación que flanquea las repeticiones tienen relación con la gravedad de los síntomas (17,18).

Para que LRS sea una herramienta valiosa en la caracterización de las expansiones TR, es crucial emplear enfoques de enriquecimiento libres de amplificación para capturar las regiones de interés. Esto permite superar las limitaciones intrínsecas de la PCR: las restricciones en las longitudes y tipos de regiones a analizar y el posible sesgo que esta técnica podría introducir. Un enfoque particularmente relevante implica la combinación de LRS con la tecnología de CRISPR-CAS9. Con CRISPR-Cas9, es posible dirigir y cortar específicamente las regiones de interés en el genoma. Al integrar ambas tecnologías, se pueden diseñar ARN guías para que CRISPR-Cas9 se enfoque en las regiones de interés, permitiendo luego que LRS secuencie el ADN nativo en estas áreas seleccionadas. Esta estrategia ha demostrado ser efectiva para la captura y caracterización de regiones con expansiones TR, tanto utilizando la plataforma de PacBio como la de ONT (38). Sin embargo, en el caso de ONT, el muestreo adaptativo (mencionado previamente en esta sección) ha comenzado a ganar relevancia como alternativa a este enfoque, ya que ofrece una simplificación en la construcción de la librería y en la construcción de un panel de genes para su secuenciación (39).

En resumen, las tecnologías de LRS están abriendo nuevas y emocionantes oportunidades en el diagnóstico e investigación de enfermedades poco frecuentes como las AH, al permitir la secuenciación en tiempo real de fragmentos extensos de ADN con alta precisión. La portabilidad de los secuenciadores de bolsillo desarrollados por ONT amplía su utilidad, permitiendo su aplicación en entornos fuera del laboratorio para propósitos de cribado y diagnóstico. A pesar de las promesas de mejorar la precisión y la eficiencia diagnóstica, aún persisten desafíos, como los costos, la complejidad y la validación clínica, que deben superarse para una adopción generalizada de la LRS en la práctica clínica. Una vez superadas estas limitaciones, se espera que la LRS se convierta en la tecnología innovadora y el estándar para el análisis genómico, permitiendo el acceso a medicina de precisión en una variedad de entornos (35).

1.8. Interpretación y clasificación de las variantes genéticas

En los apartados anteriores, se han descrito diversas metodologías de secuenciación que permiten la identificación de variantes genéticas. Sin embargo, el análisis de estas variantes presenta desafíos significativos, especialmente cuando se emplean técnicas secuenciación de segunda y tercera generación, debido al gran número de variantes detectadas, que puede llegar a alcanzar las 600,000 en WES. De este amplio conjunto, solo una minoría son responsables de enfermedades monogénicas, mientras que la mayoría forman parte de la variación genética normal o pueden influir en el riesgo de enfermedades multifactoriales.

Para asignar un significado clínico a estas variantes genéticas en el contexto de las enfermedades genéticas, se emplea un enfoque estandarizado, siendo el sistema más ampliamente adoptado la clasificación de variantes según las pautas de 2015 publicadas por el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) y la Asociación para la Patología Molecular (AMP). Estas pautas clasifican las variantes en un continuo que va desde benignas, probablemente benignas, de significado incierto, probablemente patogénicas y patogénicas, brindando un marco estructurado para la interpretación clínica de las variantes genéticas. Según lo propuesto por las pautas de 2015 de ACMG/AMP, las variantes genéticas deben clasificarse como benignas o probablemente benignas si es poco probable que estén asociadas con una enfermedad (>90% de certeza de no estar asociadas con una enfermedad); las variantes de significado incierto (VUS) no tienen suficiente evidencia para ser clasificadas como probablemente patogénicas/patogénicas o probablemente benignas/benignas; y las variantes genéticas deben clasificarse como patogénicas o probablemente patogénicas si se considera que causan la enfermedad (>90% de certeza de estar asociadas con una enfermedad)(40).

Para la clasificación se recopila información de la variante genética. Esta información se deriva de datos de población (frecuencia poblacional), datos computacionales, datos funcionales, datos de segregación, bases de datos de enfermedades y la literatura médica y científica

Aunque este proceso es fundamental para un diagnóstico preciso de enfermedades genéticas y la toma de decisiones médicas informadas, es crucial reconocer las limitaciones inherentes al análisis de variantes, ya que la clasificación final no siempre garantiza un nivel absoluto de certeza. Además, es importante tener en cuenta que la identificación de variantes patogénicas no necesariamente asegura un diagnóstico molecular confirmatorio.

1.9. Importancia del diagnóstico genético

Dada la marcada heterogeneidad clínica y genética de las AH y a veces la limitada accesibilidad a pruebas genéticas avanzadas en algunas regiones, la búsqueda del diagnóstico

genético en las AH a menudo se convierte en una odisea para los pacientes y su familia. Sin embargo, el arribo a un diagnóstico genético es fundamental, ya que aborda varios aspectos clave:

1. Precisión Diagnóstica: El diagnóstico genético identifica de forma precisa la causa subyacente de las AH. Esto le permite a los pacientes y sus familias comprender la naturaleza de la enfermedad y sus implicancias, así como acceder a información sobre la progresión de la afección y las opciones de tratamiento, en caso de que esté disponible.

2. Asesoramiento genético: La información genética obtenida puede ayudar a determinar el riesgo de recurrencia en la familia, lo cual toma especial relevancia para la toma de decisiones en el contexto de la planificación familiar.

3. Personalización del Tratamiento: Un diagnóstico genético preciso puede guiar el desarrollo de terapias y tratamientos más específicos. A medida que la investigación avanza, la identificación de las variantes genéticas puede abrir la puerta a opciones terapéuticas dirigidas y personalizadas.

4. Contribución a la Investigación: Los datos recopilados a través de las pruebas genéticas contribuyen al avance de la investigación en el campo de las AH. Conocer las variaciones genéticas causantes de la enfermedad pueden mejorar el entendimiento de los mecanismos subyacentes y llevar, en consecuencia, al desarrollo de nuevas terapias (8,13).

En definitiva, el diagnóstico genético en los pacientes con AH no solo proporciona respuestas a preguntas médicas complejas, sino que también le otorga a los pacientes conocimiento para enfrentar su condición y les permite en consecuencia, tomar decisiones informadas sobre su salud, así como establecer contacto con grupos de apoyo para pacientes y otras personas que atraviesan la misma enfermedad (20).

1.10. Epidemiología

Si bien las AH son consideradas enfermedades poco frecuentes y cada subtipo puede presentar características epidemiológicas específicas, en conjunto, las ataxias constituyen uno de los motivos de consulta más comunes en Neurogenética Clínica. Estudios epidemiológicos indican que, a nivel mundial, entre 1 y 5 de cada 100.000 habitantes sufren de ADCAs, siendo SCA3 la más prevalente. En cuanto a las ataxias autosómicas recesivas, su prevalencia poblacional es de 3 casos por cada 100.000 habitantes, siendo la AF la más común entre ellas.

No obstante, la incidencia de subtipos particulares puede variar en diferentes poblaciones y regiones del mundo debido a factores genéticos, ambientales y demográficos propios de cada país. En el caso específico de Argentina, la información precisa sobre la prevalencia de cada subtipo de AH es limitada (41). Aunque se han publicado informes aislados de casos y descripciones de

pequeñas series de pacientes con formas de AH en el territorio argentino, aún no se ha realizado un análisis sistemático que evalúe el rendimiento diagnóstico de un enfoque integral de diagnóstico molecular en este campo (41,42).

La identificación y comprensión precisa de la epidemiología de estas afecciones resultan fundamentales para optimizar la asignación de recursos, lograr diagnósticos tempranos, mejorar el manejo clínico y desarrollar terapias específicas.

En conclusión, el diagnóstico genético de las AH representa un campo en rápida evolución, impulsado por los avances en las tecnologías de secuenciación y análisis de datos. A pesar de los desafíos inherentes a la interpretación de variantes genéticas y las limitaciones en los datos epidemiológicos, especialmente en Argentina, el diagnóstico molecular preciso sigue siendo una herramienta fundamental para el manejo clínico, el asesoramiento genético y la investigación en este grupo de enfermedades. La continua mejora en las técnicas de secuenciación, junto con esfuerzos coordinados para recopilar datos epidemiológicos locales, promete mejorar significativamente nuestra capacidad para diagnosticar y tratar las AH en el futuro cercano.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Justificación e importancia de la investigación

Las AH presentan una marcada heterogeneidad genética y fenotípica, lo que plantea desafíos significativos en el diagnóstico y manejo clínico. La identificación precisa de la causa genética subyacente es crucial para proporcionar un tratamiento y asesoramiento personalizado. Sin embargo, los pacientes y sus familias a menudo enfrentan una prolongada odisea diagnóstica, exacerbada por la escasez de recursos y la naturaleza poco frecuente de estas enfermedades. Esta situación subraya la urgente necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico más eficaces y precisos.

Los datos epidemiológicos locales son de vital importancia en el contexto de las AH. Conocer la frecuencia de los subtipos de AH en la población argentina y los fenotipos asociados más comunes para cada tipo de ataxia permitiría:

- Aplicar una metodología diagnóstica racional.
- Priorizar el estudio de genes con mayor probabilidad de resultados positivos.
- Mejorar la eficiencia del proceso diagnóstico.
- Reducir la duración de la odisea diagnóstica.
- Contribuir significativamente a mejorar la calidad de vida de las personas afectadas.

Los avances en las tecnologías de secuenciación ofrecen oportunidades sin precedentes para el estudio de las AH:

- Permiten una caracterización más precisa de las regiones repetitivas etiopatogénicas del genoma en ataxias causadas por expansiones de TR.
- Facilitan una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares subyacentes a estos trastornos.
- Abren el camino hacia el desarrollo de pruebas moleculares más rápidas, accesibles y abarcativas.

A pesar de los avances en la comprensión de las AH en Argentina, persisten importantes lagunas de conocimiento que justifican una investigación más exhaustiva:

- Prevalencia precisa de los diferentes subtipos de AH en la población argentina.
- Mecanismos mutacionales específicos que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades en nuestra población.
- Identificación de factores modificadores genéticos que podrían influir en la gravedad y el curso clínico de las AH.

La investigación en estas áreas no solo contribuiría al conocimiento científico, sino que también tendría implicaciones directas para el diagnóstico, pronóstico y manejo de los pacientes con AH en Argentina.

En conclusión, esta investigación se justifica por la necesidad crítica de mejorar el diagnóstico y manejo de las AH en Argentina. Al abordar las brechas de conocimiento existentes y aprovechar las nuevas tecnologías de secuenciación, este estudio tiene el potencial de impactar significativamente en la vida de los pacientes con AH, acelerar el proceso diagnóstico y contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas más personalizadas en el futuro.

2.2. Hipótesis central

La hipótesis central de este trabajo postula que el desarrollo e implementación de algoritmos diagnósticos que incorporen técnicas de secuenciación genómica de segunda generación será fundamental para:

1. Identificar con precisión las causas subyacentes de las AH.
2. Comprender la epidemiología local en una cohorte de pacientes afectados.

Además, se plantea que la integración de metodologías de secuenciación de segunda y tercera generación permitirá:

3. Explorar los factores genéticos modificadores implicados en estas condiciones.
4. Mejorar significativamente el rendimiento diagnóstico.
5. Enriquecer el conocimiento científico en los campos de la genética y la neurología.

2.3. Objetivos

Esta investigación tiene como objetivo principal contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de las AH. Específicamente, se busca identificar mutaciones etiopatogénicas y factores genéticos modificadores en una cohorte de pacientes afectados por este trastorno, mediante la integración sinérgica de técnicas avanzadas de secuenciación genómica y análisis bioinformáticos en un centro de salud e investigación biomédica enfocado en el desarrollo de la genómica y la bioinformática traslacional en el país.

A fin de cumplir con este objetivo se diseñaron dos proyectos, cada uno con su propio objetivo específico como se detalla a continuación.

Proyecto I:" Desarrollo de una estrategia de diagnóstico genético-molecular de las ataxias hereditarias".

Objetivo Especifico 1 (OE1):

Realizar un análisis sistemático para evaluar exhaustivamente la estrategia de diagnóstico genético-molecular integral implementada por el grupo de Neurogenética de la División de Neurología del Hospital J.M. Ramos Mejía. Este análisis permitirá:

a. Caracterizar clínica y genéticamente nuestra población de estudio.
b. Establecer algoritmos diagnósticos que mejoren la precisión diagnóstica para un uso racional de recursos.
c. Desarrollar y validar paneles multigénicos para el diagnóstico genético-molecular de las ataxias mediante el uso de tecnologías de secuenciación masiva en paralelo o NGS.

Proyecto II:" Utilización de la secuenciación de tercera generación en el diagnóstico de las ataxias hereditarias".

Objetivo Específico 2 (OE2)

Explorar el uso de la secuenciación de tercera generación para:

a. Mejorar el diagnóstico de las AH.
b. Caracterizar molecularmente las regiones etiopatogénicas del genoma en las ataxias causadas por expansiones de TR.

Para proporcionar una estructura clara y coherente del trabajo realizado, los apartados de metodología, resultados y discusión se organizaron en dos secciones:

- Una sección se enfocará en el Proyecto I: "Desarrollo de una estrategia de diagnóstico genético-molecular de las ataxias hereditarias", abarcando su objetivo específico correspondiente (OE1). Se detallarán las técnicas empleadas, los hallazgos obtenidos y su interpretación en el contexto del diagnóstico de estas enfermedades.
- La segunda sección estará dedicada al Proyecto II: "Utilización de la secuenciación de tercera generación en el diagnóstico de las ataxias hereditarias", abordando el objetivo específico (OE2). Se describirán los métodos utilizados y los resultados obtenidos mediante esta tecnología avanzada.

Esta división permite diferenciar claramente los enfoques y hallazgos de cada proyecto, facilitando así una comprensión integral del trabajo realizado.

3. METODOLOGÍA

3.1. Proyecto I(OE1): “Desarrollo de una estrategia de diagnóstico genético-molecular de las ataxias hereditarias”

3.1.1. Tipo de estudio y Pacientes

Para cumplir con el OE1, se llevó a cabo un estudio de tipo prospectivo, observacional, descriptivo y analítico. La población del estudio se compuso de pacientes adultos y pediátricos con sospecha de AH remitidos entre mayo de 2008 y diciembre de 2019 al Programa de Ataxia Crónica y Progresiva que se lleva a cabo en la Unidad de Neurogenética y Área de Trastornos del Movimiento de la División de Neurología del Hospital J.M. Ramos Mejía Buenos Aires, Argentina.

Para la selección de pacientes se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

a. Síndrome de ataxia crónica y progresiva, considerando:

- Ataxia: a la falla de coordinación estática y dinámica puesta de manifiesto en alguna de las siguientes pruebas: Índice-nariz, talón-rodilla, índice-índice, Romberg, Tándem.
- Ataxia crónica: mayor a un año de evolución.

Criterios de exclusión*:*

a. Negativa del enfermo o su representante legal a participar en el estudio.
b. Ataxia secundaria a lesión estructural (ACV, tumor, infecciosas/ inflamatorias), enfermedad celiaca, drogas, tóxicos, diagnóstico de atrofia multisistémica.
c. Ataxia puramente sensitiva

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron sometidos a una evaluación clínica exhaustiva y a pruebas moleculares para detectar causas genéticas conocidas de AH. Las pruebas moleculares incluyeron análisis de fragmento, PCR seguido de secuenciación de Sanger y secuenciación de segunda generación o NGS (TS, WES o WGS). Los datos obtenidos de la evaluación clínica y las pruebas genéticas se analizaron para evaluar el rédito diagnóstico de los algoritmos propuestos y para investigar la correlación genotipo-fenotipo en estos trastornos. Todos los pacientes adultos y los padres de pacientes pediátricos dieron su consentimiento informado para participar y el estudio fue aprobado por el comité ético institucional de Hospital JM Ramos Mejía (Anexo 1). En todos los pacientes se realizó una historia clínica detallada donde se registraron las características demográficas, los antecedentes familiares y las principales características clínicas. La escala semicuantitativa SARA(22) (Anexo 2) se utilizó para evaluar la disfunción cerebelosa y cuantificar la severidad de la ataxia.

3.1.2. Examen Clínico

A todos los pacientes se les realizó un examen neurológico exhaustivo llevado a cabo por un especialista en Neurogenética, con el objetivo de obtener una evaluación completa y estandarizada.

A partir del examen neurológico, se recopiló información detallada en la historia clínica de cada paciente, la cual incluyó los siguientes aspectos:

a. Edad de inicio de los síntomas.
b. Duración de la enfermedad desde la aparición del primer síntoma relacionado con ella.
c. Familigrama detallado que refleje modo de herencia y anticipación clínica si la hubiese
d. Atrofia cerebelosa
e. Afectación extracerebelosa, como la presencia o ausencia de:

- Miocardiopatía.
- Diabetes.
- Polineuropatía.
- Síntomas piramidales.
- Afectación del nervio óptico.

El examen neurológico relacionado con la afectación extracerebelosa además exploró elementos como los movimientos oculares sacádicos horizontales y verticales, y de seguimiento lento, la presencia o ausencia de nistagmo y signos de apraxia oculomotora. También se investigó la presencia de movimientos anormales, como corea, mioclonía, distonía, parkinsonismo o temblor.

Para identificar neuropatía periférica, se observaron signos como la disminución o ausencia de reflejos osteotendinosos, afectación sensorial distal superficial o profunda, así como cualquier evidencia electrofisiológica que indicara anormalidades en la conducción nerviosa.

Se realizaron análisis de laboratorio de rutina y se determinaron marcadores bioquímicos, incluyendo la alfafetoproteína (AFP) sérica, albúmina, proteinograma electroforético, perfil metabólico y creatina fosfoquinasa, (CPK) como parte de la evaluación clínica integral.

La presencia de atrofia cerebelosa se evaluó mediante imágenes cerebrales de resonancia magnética cerebral (RMN) de alta resolución con secuencias T1, T2 y Flair.

La severidad de la ataxia se cuantificó mediante una puntuación en una escala del 1 al 40, utilizando la escala SARA (22) (Anexo 2). Esta escala ha sido validada para estratificar severidad en pacientes con ataxias espinocerebelosas y AF.

3.1.3. Estratificación de los pacientes.

Posterior a la evaluación clínica y al considerar las características fenotípicas de cada individuo en la cohorte estudiada, se formularon algoritmos de evaluación clínica y molecular de cada subpoblación (**Figura 6**):

- Ataxia con historia familiar sugerente de patrón de herencia AD
- Ataxia con historia familiar sugerente de patrón de herencia AR
- Ataxia esporádica

Los algoritmos propuestos se realizaron con el propósito de investigar los defectos moleculares subyacentes. Este algoritmo implicó la selección de genes candidatos y la aplicación de diversas metodologías de diagnóstico genético según el mecanismo molecular potencialmente involucrado. Este proceso se aplicó a cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. A continuación, se describe detalladamente la metodología utilizada en cada una de las estrategias aplicadas.

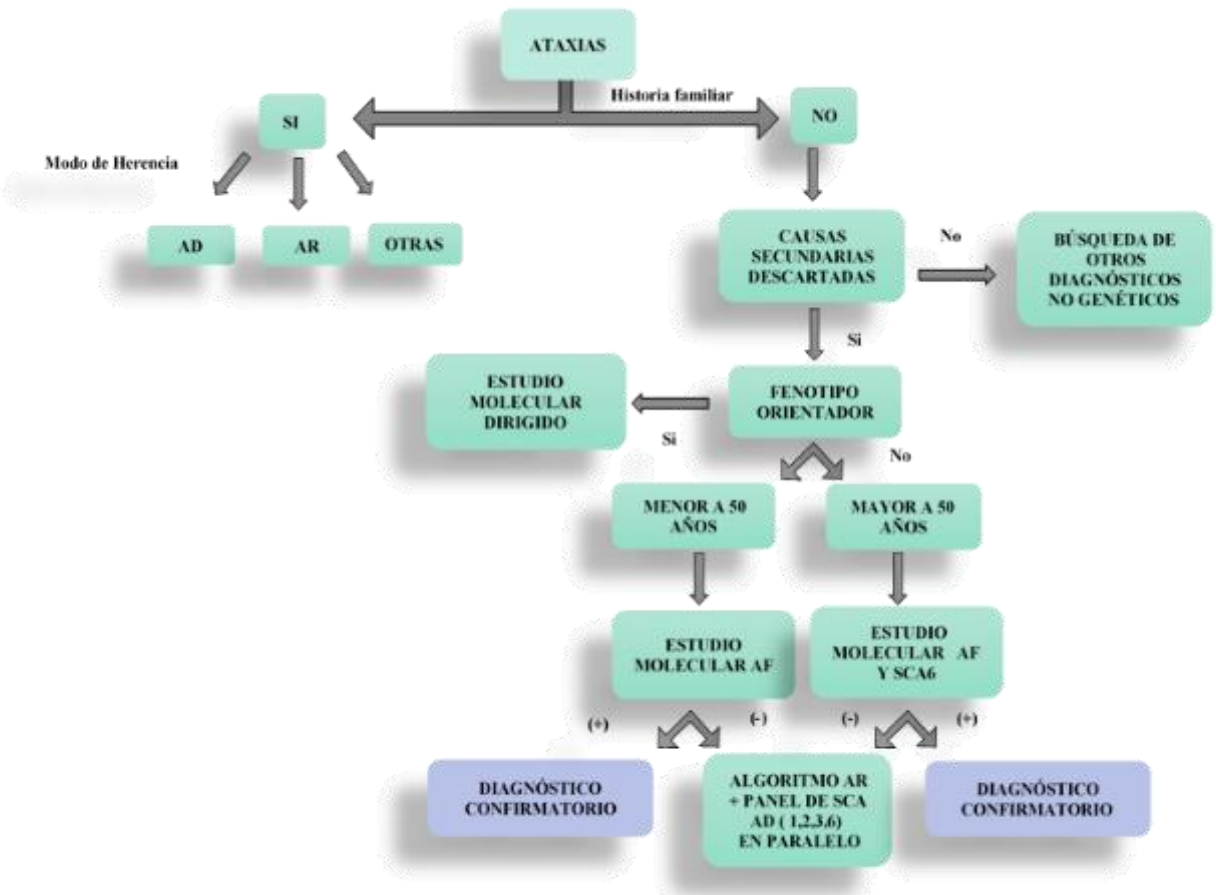


***Figura 6. Aproximación diagnóstica inicial. AD**: Autosómico Dominante; **AF**: Ataxia de Friedreich; **AR**: Autosómico Recesiva; SCA: Ataxia espinocerebelosa.*

3.1.3.1. Ataxias autosómicas dominantes

En todos los pacientes con un pedigree consistente con un patrón de herencia AD, se realizó un panel multigénico de ataxias AD que incluyó pruebas para la detección de expansiones repetidas anormales de CAG causantes de los subtipos de SCAs más prevalentes a nivel mundial (SCA1, SCA2, SCA3, y SCA6) mediante análisis de fragmento.

El fenotipo de cada paciente individual determinó el orden en que se realizó cada una de estas pruebas. En los casos en los que el fenotipo no fue distintivo de una forma específica de SCA, se realizó simultáneamente el panel completo de ataxias dominantes. Si el fenotipo era característico de una SCA menos prevalente u otra ataxia dominante, se realizaron estudios moleculares específicos basados en nuestra sospecha clínica (por ejemplo, SCA7, enfermedad de Huntington, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker entre otras) (**Figura 7**).

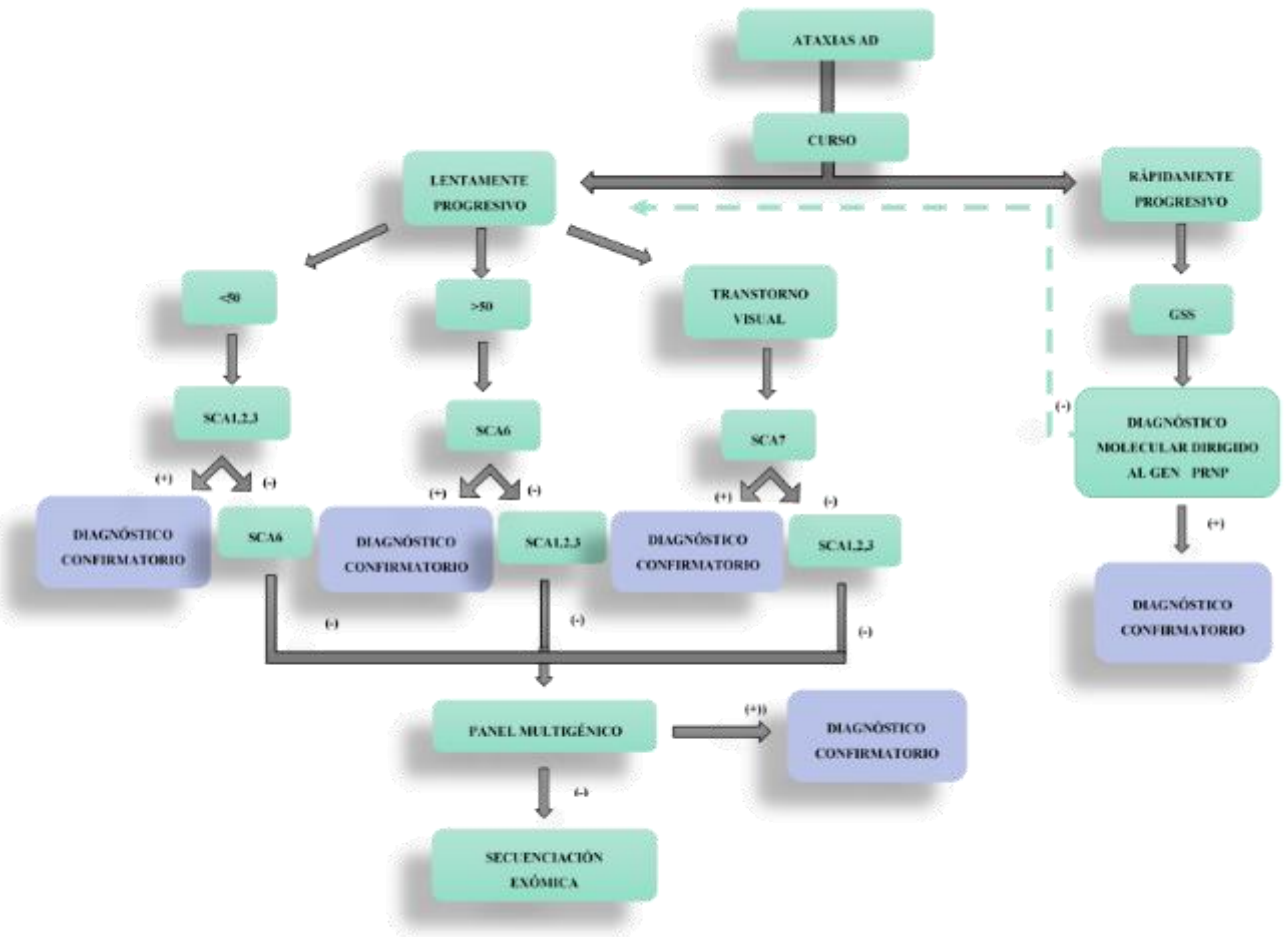


***Figura 7. Aproximación diagnostica en ataxias de herencia autosómica dominante**. **AD:** Autosómico Dominante**; GSS:** Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker**; SCA:** Ataxia Espinocerebelosa.*

3.1.3.2. Ataxias autosómicas recesivas

En el grupo de pacientes con antecedentes familiares relacionados con un patrón de herencia AR, se llevó a cabo una búsqueda inicial de expansiones anormales de repeticiones GAA en el intrón 1 del gen FXN, causante de AF. Si se observó una expansión anormal en solo uno de los alelos, se procedió a investigar los cinco exones del gen mediante PCR y secuenciación de Sanger en búsqueda de variantes puntuales. En los casos en que este análisis arrojó un resultado negativo, se consideraron factores como el fenotipo, los marcadores bioquímicos y las imágenes neurológicas para determinar si los pacientes presentaban características sugerentes de una enfermedad específica (como la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, la ataxia con apraxia oculomotora 1 o 2, la xantomatosis cerebrotendinosa, entre otras). En tales situaciones, se realizó secuenciación de los genes individuales correspondientes.

En aquellos casos en los que los pacientes presentaron fenotipos indeterminados, se sometieron a un análisis de secuenciación de segunda generación, como se detalla en las secciones posteriores (**Figura 8)**.

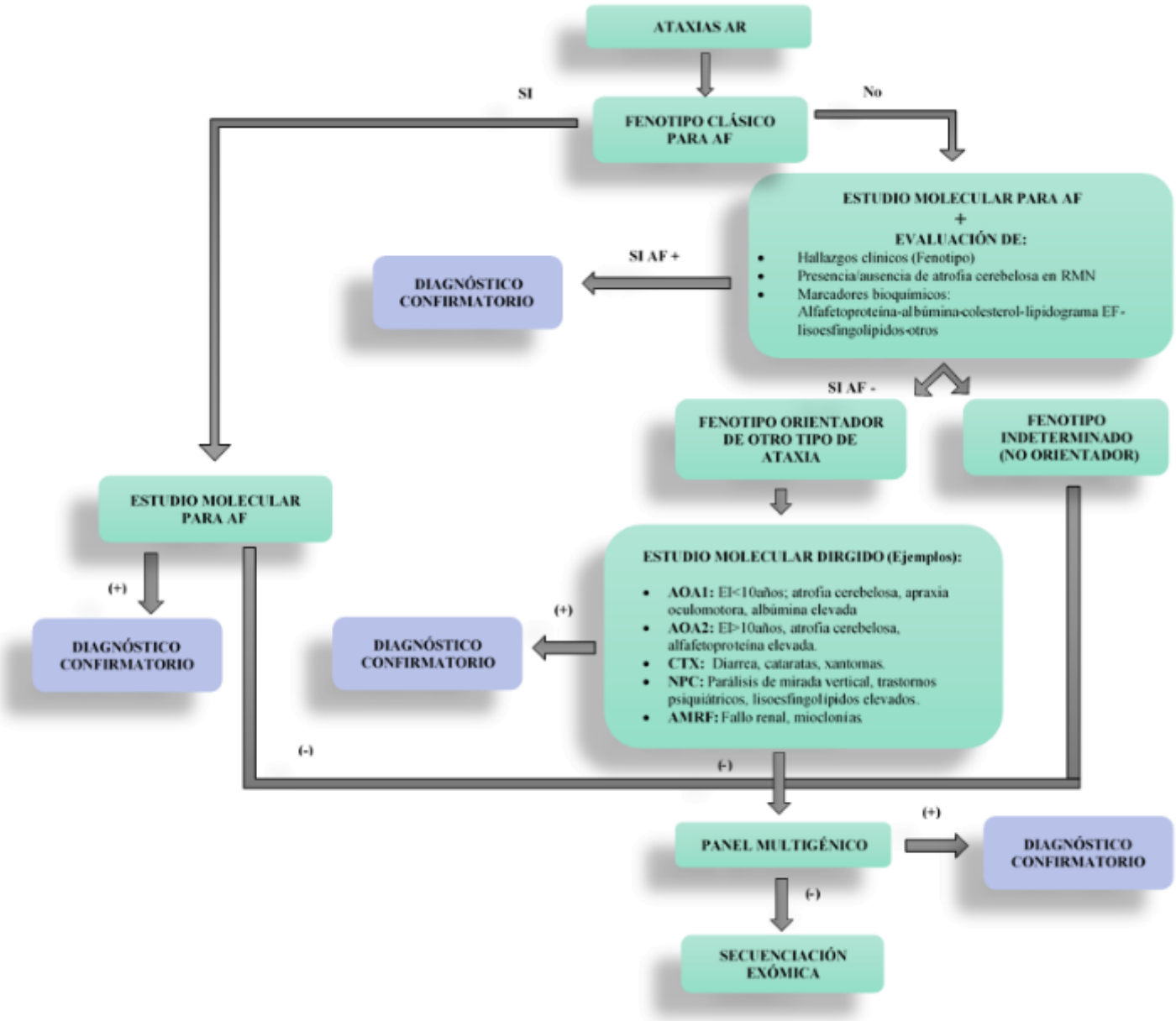


Figura 8. Aproximación diagnóstica en ataxias autosómico recesiva. AF: *Ataxia de Friedreich;* ***AOA:*** *Ataxia con Apraxia Oculomotora****; CTX:*** *Xantomatosis Cerebrotendinosa****; NPC:*** *Enfermedad de Niemann Pick tipo C****; ARMF:*** *Síndrome de mioclonías en acción****; EI:*** *Edad de inicio.*

3.1.3.3. Ataxia sin antecedente de familiares afectados (casos esporádicos)

Para los pacientes con ataxia esporádica, en los que se descartaron causas secundarias, se tuvo en cuenta el fenotipo, los marcadores bioquímicos y las neuroimágenes para definir si reunían características sugestivas de una enfermedad específica que dirigiera a la secuenciación de genes individuales. Si presentaron fenotipos indeterminados, se tuvo en cuenta la edad de inicio de los síntomas: en los individuos con una edad de inicio inferior a 50 años, se realizaron primero las pruebas para AF; en caso contrario, se realizaron al mismo tiempo las pruebas para AF y SCA6. Por último, cuando no se obtuvo un diagnóstico confirmatorio tras estas pruebas iniciales, el enfoque diagnóstico continuó como en las ataxias AD y AR simultáneamente (descritas en secciones anteriores).

3.1.3.4. Ataxias no diagnosticadas por las pruebas iniciales

Finalmente, aquellos casos con pruebas iniciales no diagnósticas se estudiaron mediante NGS que incluyeron TS, WES o WGS según la disponibilidad en cada caso.

3.1.4. Procedimientos de diagnóstico genético

3.1.4.1. Procesamiento de la muestra

Toma de muestra

Se obtuvieron dos mililitros de sangre total de cada paciente mediante venopunción en tubos anticoagulados con EDTA y se preservaron a -20 C° hasta su utilización tras la firma del consentimiento informado.

Extracción de ADN

Se purificó el ADN genómico total utilizando algunos los siguientes kits comerciales: QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen o EasyPure® Blood Genomic DNA Kit, Transgene Biotech según la disponibilidad al momento de la extracción.

El protocolo para la extracción de ADN genómico utilizando el QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) fue el siguiente*:*

1.Se colocaron 20 µl de Proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y consecutivamente se agregaron 200 µl de sangre entera periférica. Se agregó una cantidad equivalente de buffer AL a la muestra y se mezcló por vortex durante 15 segundos.

2. Se incubó durante 10 minutos a 56°C, mezclando paulatinamente para asegurar la lisis celular.

3. Se centrifugó brevemente y se agregaron 200 µl de etanol absoluto a la muestra y se volvió a mezclar por vortex.

4. Se trasvasó el contenido del tubo a una columna QIAamp Mini spin column y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.

5. Se descartó el eluido y se agregaron 500 µl del buffer AW1 a la columna. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.

6. Nuevamente se descartó el eluido y se agregaron 500 µl de buffer AW2 a la columna. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.

7. Para asegurar que todo el buffer AW2 se eliminó de la columna, se descartó el eluido y se secó la columna centrifugando a 14000 rpm durante 1 minuto.

8. Se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se agregaron 100 µl de buffer AE para eluir el ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y se centrifugó la columna a 8000 rpm durante 1 minuto.

9.Se descartó la columna y se procedió a evaluar la calidad del ADN extraído

El protocolo para la extracción de ADN genómico utilizando el EasyPure® Blood Genomic DNA Kit, (Transgene Biotech) fue el siguiente:

1.Se colocaron 200 µl de sangre entera periférica, 20 µl de Proteinasa K y 500 µl del buffer BB3 en un microtubo de 1.5 mL se mezcló por vortex durante 15 segundos.

2. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.

3. Se centrifugó brevemente y se trasvasó el contenido del tubo a una columna. Se centrifugó a 12.000 g durante 30 segundos.

5. Se descartó el eluido y se agregaron 500 µl del buffer CB3 a la columna. Se centrifugó a 12.000 g durante 30 segundos.

6. Nuevamente se descartó el eluido y se repitió el paso 6.

7. Para asegurar que todo el buffer WB3 se eliminó de la columna, se descartó el eluido y se secó la columna centrifugando a 12.000 g durante 2 minutos.

8. Se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se agregaron 100 µl de buffer AE para eluir el ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y se centrifugó la columna a 12.000 g durante 1 minuto.

9.Se descartó la columna y se procedió a evaluar la calidad del ADN obtenido.

Calidad de la muestra de ADN.

Luego de completar la extracción de ADN, se procedió a evaluar la integridad de la muestra mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1,5 % y su posterior visualización en un transiluminador de luz Uv. Al mismo tiempo, se cuantificó su concentración (en ng/uL) utilizando uno de los dos fluorómetros disponibles en el laboratorio: Invitrogen Qubit Fluorometer de ThermoFisher o Quantus™ Fluorometer de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante.

Banco de ADN

El ADN extraído fue conservado en freezer a -20 C. Cada una de las muestras fue rotulada y clasificada con código anonimizado.

3.1.4.2. Pruebas moleculares

Evaluación de expansiones de TR mediante análisis de fragmento.

Para el análisis de las SCAs, se llevó a cabo un análisis de fragmentos que incluyó la amplificación por PCR utilizando cebadores marcados con un fluoróforo 5'-FAM específicos para cada gen (**ver Tabla 5**), seguido del análisis de la longitud de los fragmentos mediante electroforesis capilar conforme a procedimientos estándar.

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µL, de acuerdo con el siguiente protocolo: 37.2 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, 0.2 µL de GoTaq DNA polimerasa (5 U/µl), 0.3 µL de cada cebador forward y reverse (100 µM) (**Tabla 5**) y 2 µL de ADN genómico como templado. En algunos casos se adicionó 3% (v/v) DMSO (**ver Tabla 5**).

Se utilizó un termociclador Veriti™ 96 Well para las amplificaciones, con las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a la temperatura de *annealing* (Ta) (**consultar Tabla 5**) y 30 segundos a 72 °C, finalizando con un paso de extensión de 5 minutos a 72 °C. Se incluyeron controles negativos sin templado (NTC) y controles positivos en cada ronda de amplificación.

En una primera etapa, se confirmó la presencia del producto de amplificación esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE con 3 uL de Bromuro de Etidio. Las condiciones de corrida fueron 95V por 20-30 minutos. Los geles se revelaron en transiluminador de UV. Posteriormente, se realizó una electroforesis capilar utilizando un equipo ABI 3730XL (Life Technologies, California, USA), como servicio subcontratado a Macrogen Inc (Corea). Los resultados de la electroforesis capilar fueron analizados utilizando el software Genemapper (v.4). El tamaño de

las repeticiones de cada alelo se calculó basado en el tamaño del fragmento amplificado en comparación con un marcador de tamaño estándar.

Tabla 5. Cebadores utilizados para las reacciones de PCR fluorescente y TP-PCR en análisis de fragmento en las diferentes ataxias causadas por expansión de secuencias repetitivas EH*: Enfermedad de Huntignton.* ***SCA:*** *ataxia espinocerebelosa,* ***AF:****Ataxia de Friedreich.* ***Ta:*** *temperatura de annealing.* ***pb****: pares de bases,* ***Fw****: forward,* ***Rv:*** *reverse* ***N/A:*** *No aplica. * El tamaño esperado del producto de amplificación corresponde a los alelos que se encuentran dentro del rango normal de TR, de acuerdo con la secuencia de ADN disponible en bases de datos como Ensembl.*

Ataxia	Gen	Exón/ Intrón	Cebador Secuencia ADN (5´-3´)		Ta (°C)	Aditivo	Tamaño esperado (pb)*
SCA 1	*ATXN1*	Exón 8	Fw	FAM- AACTGGAAATGTGGACGTAC	57	N/a	212
			Rv	CAACATGGGCAGTCTGAG			
SCA2	*ATXN2*	Exón 1	Fw	FAM- CGTGCGAGCCGGTGTATGGG	66	DMSO	172
			Rv	GGCGACGCTAGAAGGCCGCT			
SCA3	*ATXN3*	Exón 10	Fw	FAM- CCAGTGACTACTTTGATTCGTGA	60	N/A	205
			Rv	GGCTGGCCTTTCACATGGAT			
SCA6	*CACNA1*	Exón 47	Fw	FAM-CACGTGTCCTATTCCCCTGTGATCC	65	N/A	141
			Rv	TGGGTACCTCCGAGGGCCGCTGGTG			
SCA7	*ATXN7*	Exón 3	Fw	GCGGATGACGTCAGGG	57	N/A	427
			Rv	FAM-AAACGAAGCATCTCTGCCC			
SCA17	*TBP*	Exón 3	Fw	CCTTATGGCACTGGACTGAC	61	N/A	245
			Rv	GTTCCCTGTGTTGCCTGCTG			
EH	*HTT*	Exón 1	Fw	FAM-CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT	63	DMSO	160
			Rv	CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC			
AF	*FXN*	Intrón 1	Fw	GGAGGGATCCGTCTGGGCAAAGG	66	N/A	468
			Rv	CAATCCAGGACAGTCAGGGCTTT			
			FriTTP3	CAATCCAGGACAGTCAGGGCTTT	60	N/A	N/A
			FriTTP4	TACGCATCCCAGTTTGAGACG			
			FriTTP5	TACGCATCCCAGTTTGAGACGGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA			

Para el diagnóstico de AF, se llevó a cabo un screening mediante PCR en combinación con una TP-PCR para detectar alelos con expansiones de TR. Como se detalló en la introducción, la TP-

PCR se emplea para identificar alelos con más de 100 repeticiones (ver **Figura 2B**). La TP-PCR fue seguida por electroforesis capilar.

La reacción de PCR se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito para las SCAs. La reacción de TP-PCR se llevó en volumen total de 50 µL de la siguiente manera: 33.75 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, 0.25 µL de GoTaq DNA Polymerase (5 U/ µL), 1 µL de cada cebador (TTP1 y TPP4 a una concentración de 100 µM, TPP3 a una concentración de 10 µM) y 2 µL de ADN genómico.

Para la amplificación por TP-PCR se utilizó un termociclador Veriti™ 96 Well, con las siguientes condiciones: un paso inicial de 3 minutos a 95 °C, seguido de 32 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72 °C, finalizando con un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C. En cada ronda de amplificación se procesaron como controles internos, muestras negativas y positivas y un control negativo de amplificación sin templado (NTC).

Los productos de amplificación de PCR y TP-PCR se corroboraron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% en buffer TAE con 3 uL de Bromuro de Etidio. Las condiciones de corrida fueron 95V por 30-40 minutos. Los geles se revelaron en transiluminador de UV. La TP-PCR fue seguida de una electroforesis capilar utilizando un equipo ABI 3730XL (Life Technologies, California, USA), como servicio subcontratado a Macrogen Inc (Corea). Los resultados de la electroforesis capilar fueron analizados utilizando el software Genemapper (v.4).

Para la interpretación de los resultados, se consideraron los hallazgos obtenidos de ambas pruebas de PCR. En los pacientes en los que se detectó el patrón de escalera característico de la expansión tras la electroforesis capilar, se hizo una distinción entre individuos heterocigotos y homocigotos para la expansión utilizando el análisis de PCR convencional. Este método solo permite la amplificación de alelos no expandidos.

En los casos en los que se identificó únicamente un alelo expandido, se procedió con una PCR seguida de secuenciación por Sanger de las regiones codificantes del gen *FXN* (* 606829) a partir de cebadores de diseño propio. El diseño de cebadores se realizó utilizando el software de acceso libre Primer BLAST del NCBI (disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) en base a la secuencia de referencia NM_000144.5 de GenBank. Se siguieron las consideraciones estándar para el diseño de cebadores, como asegurar que tuvieran una longitud entre 16 y 24 pares de bases, que el contenido de C-G estuviera entre el 40% y el 60%, y que la temperatura de fusión (*melting*) de cada cebador del conjunto fuera similar. Además, se evaluaron los valores termodinámicos de formación de dímeros o estructuras secundarias utilizando la herramienta gratuita Oligo Analyzer de Integrated DNA technologies (IDT) (disponible en https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer). Los cebadores seleccionados fueron sintetizados

por Genbiotech (Argentina) o IDT (USA). Para determinar los parámetros de ciclado óptimos, se consideraron la concentración de ADN de las muestras, el tamaño del amplicón a generar y la temperatura de fusión de los cebadores. Durante la puesta a punto se llevó a cabo un gradiente de temperatura que permitió determinar la temperatura de *annealing* óptima para cada reacción. Para evaluar la especificidad de la reacción, se realizó una corrida electroforética de los productos amplificados en un gel de agarosa 1,5% teñido con Bromuro de Etidio y revelado por luz UV. Dicha especificidad se midió teniendo en cuenta, la presencia del producto de amplificación el tamaño esperado y con buena intensidad de banda y la ausencia de productos inespecíficos y de dímeros de cebadores. La secuencia de los cebadores y el tamaño del amplicón esperado para cada juego de cebadores comparados en el estudio se detallan en la **Tabla 6**. La secuenciación de Sanger se realizó como un servicio subcontrato de Macrogen Inc (Corea). Una vez recibidas las secuencias se analizaron los electroferogramas mediante el programa Finch Tv chromatogram viewer 1.4.0 (Geospiza Inc).

Tabla 6. Cebadores utilizados para analizar mediante PCR y secuenciación de Sanger los 5 exones del gen FXN en pacientes con sospecha de Ataxia de Friedreich (AF). Ta: *temperatura de annealing.* ***pb;*** *pares de bases,* ***Fw****: forward,* ***Rv:*** *reverse*

Gen	Exón-Intrón	Cebador		Ta	Tamaño (pb)
			Secuencia (5´-3´)		
FXN	1	Fw	ACAGAAGAGTGCCTGCGG	59	378
		Rv	CGGGGTGAGCTAGTCCAG		
FXN	2	FW	GGTTACAGGCACTCGAATGTAG	58	287
		Rv	TGCTCAGGAAGAAAACCAGG		
FXN	3	Fw	AAAATGGAAGCATTTGGTAATCA	54	228
		Rv	AGTGAACTAAAATTCTTAGAGGG		
FXN	4	Fw	AAGCAATGATGACAAAGTGCTAAC	57	255
		Rv	CGACATTTCTTAAATGGTCCAC		
FXN	5	FW	TACATCTGTAGCACAAAAATGGC	59	751
		Rv	AGGGGTATCATGTGAGGGAGG		

Evaluación de SNVs, InDels pequeñas

PCR seguida de secuenciación de Sanger

La enfermedad de Gerstmann-Straussler (GSS), de Niemann Pick tipo C (NPC), Epilepsia Mioclónica Progresiva, Xantomatosis Cerebrotendinosa y SCA28, se estudiaron mediante PCR seguida de secuenciación por Sanger los genes *PRNP* (*176640), *SCARB2* (*602257), *CYP27A1* (*606530) y *AFG3L2* (* 604581) respectivamente. Para cada reacción de PCR, se emplearon cebadores de diseño propio, siguiendo un proceso similar al explicado para los exones del gen *FXN*.

Estos cebadores permitieron el análisis de las regiones más relevantes de los genes mencionados. A continuación, se detalla el análisis de cada región:

Para el análisis del gen *PRNP*, se estudiaron los exones 21 y 22 cuyo diseño de oligos se realizó en base la secuencia de referencia NM_000311.3 del GRCh37(hg19) obtenida en el NCBI.

Para examinar el gen *SCARB2* se diseñaron primers específicos para el exón 5 y las regiones intrónicas adyacentes. Se recurrió a la secuencia de referencia del NCBI NM_005506.3 del GRCh37 (hg19).

Para analizar al gen *CYP27A1*, se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los 9 exones en base a la secuencia de referencia del NCBI NM_000784.3 del GRCh37 (hg19).

Para el estudio molecular del gen *AFG3L2*, se diseñaron 2 juegos de cebadores, que permitieron examinar la región codificante de los exones 15 y 16. Los cebadores fueron diseñados siguiendo la secuencia de referencia de GenBank NM_006796.3 en base al GRCh38 (hg18).

En todas las regiones mencionadas, la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL, siguiendo el protocolo detallado a continuación: se utilizó 37.2 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, 0.2 µL de GoTaq DNA polimerasa (5 U/µl), 0.3 µL de cada cebador forward y reverse (100 µM) (**Tabla 7**), y 2 µL de ADN genómico como templado. Además, se incluyó un control negativo de amplificación sin templado (NTC) en cada ciclo de amplificación.

Para evaluar la especificidad de la reacción, se llevó a cabo una electroforesis de los productos amplificados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y revelado mediante luz UV. La especificidad se determinó mediante la presencia de un amplicón del tamaño esperado con una intensidad de banda adecuada, así como la ausencia de productos inespecíficos y dímeros de primers.

Una vez obtenidos los amplicones esperados, se procedió a su secuenciación utilizando la técnica de Secuenciación de Sanger, a través de un servicio subcontratado de Macrogen Inc (Corea). Los resultados se analizaron utilizando el software FinchTV chromatogram viewer 1.4.0.(Geospiza Inc.)

Tabla 7. Cebadores utilizados para las reacciones de PCR y secuenciación de por Sanger en las diferentes ataxias. SCA28: *ataxia espinocerebelosa tipo 28****. GSS:*** *Gerstmann-Straussler****, NPC:*** *Niemann Pick tipo C****. Ta:*** *temperatura de annealing.* ***pb;*** *pares de bases,* ***Fw****: forward,* ***Rv:*** *reverse*

Subtipo de ataxia	Gen	Exón-Intrón	Cebador	Secuencia (5´-3´)	Ta (°C)	Tamaño
SCA28	*AFG3L2*	Exón 15	FW	CACTGCTAGATCACATCCCACT	59	459
			Rv	AGCCTAAAACAGTGAAGCACAA		
SCA28	*AFG3L2*	Exón 16	FW	TGTTGTAGGTGTTATGCCTGGG	59	527
			Rv	AACATCAGAACGAACGGACC		
GSS	*PRNP*	Exón 21	Fw	ACCATTGCTATGCACTCATTC	61	574
			Rv	GGGTAACGGTGCATGTTTTC		
GSS	*PRNP*	Exón 22	Fw	AACCAACATGAAGCACATGG	61	505
			Rv	ATACCGCCTCCCTCAAGC		
			Rv	AGAATTCCCTTTCAGTAATGTCC		
Epilepsia Mioclónica Progresiva	*SCARB2*	Exón 5	Fw	CTTCACCACACCATCTGGG	56	374
			Rv	TGTTTTACCACCATCTTGATTTG		
Xantomatosis Cerebrotendinosa	*CYP27A1*	Exón 1	Fw	CCTGCACTGCTGTCTGGG	61	390
			Rv	CCTCTAGCCTCTCTGTTCCG		
		Exón 2	Fw	CTGTCCTGGGAGCACCTG	63	318
			Rv	CTGTGCCCACTGTCTTTCG		
		Exón 3	Fw	GGTGGACTTCAGGGTGAGAAG	63	339
			Rv	AGCACAACCTCTCCCTGACC		
		Exón 4	Fw	TCCTGGATTCCATATGTCCTG	60	318
			Rv	TGATGCACAGACCTGGAGTC		
		Exón 5	Fw	GTCGGAGTGGCTCTTGGTC	60	307
			Rv	AGGGAACTGGTTCAGGTTGG		
		Exón 6-7	Fw	CCCATTACTGGCCTCTTTCC	60	565
			Rv	AGCATGAATGCCTCTCTTCG		
		Exón 8-9	Fw	CTAGAGAGCCCGATTGCCC	63	617
			Rv	CACTGTGCCAGAGCTGGAG		

Secuenciación de segunda generación

Generación de librerías y secuenciación

En un total de 13 pacientes, se llevó a cabo un estudio de un panel multigénico para AH, mediante el empleo del kit comercial *TruSight One Sequencing Panel (Illumina Inc.).* Para ello el ADN genómico fue fragmentado químicamente y la fracción codificante de 4813 genes (alrededor de 62.000 exones) fue enriquecida en solución siguiendo procedimientos estandarizados recomendados por el fabricante. Posteriormente, en tandas de 3 muestras, se realizaron corridas de secuenciación en el equipo *Illumina MiSeq* del IIMT, UA logrando coberturas promedio mayores a 70x, siguiendo procedimientos estandarizados recomendados por el fabricante. En total se realizaron 3 corridas de secuenciación para un análisis total de 9 muestras. Los 4 pacientes restantes fueron sometidos a

procedimientos similares, pero en laboratorios comerciales de diagnóstico genético. El análisis e interpretación estuvo en primera instancia limitado al conjunto de genes incluido en el panel virtual seleccionado para este grupo de pacientes como se describe abajo en el apartado Análisis Bioinformático.

En un total de 9 pacientes se realizaron estudios de secuenciación completa del exoma (8 sujetos) o genoma (1 sujeto). Para ambos análisis, a partir del ADN genómico extraído se construyeron las librerías de secuenciación correspondiente. Para WES se utilizó principalmente el kit comercial *SureSelect Human All Exon v4 (AgilentTechnologies, Santa Clara, CA, EE. UU.),* que permite estudiar aproximadamente, 21.000 genes y 350.000 regiones codificantes del genoma humano. Según instrucciones del fabricante en una primera instancia el ADN genómico fue fragmentado químicamente y posteriormente, en una sucesión de pasos, los fragmentos codificantes fueron enriquecidos con las sondas de oligonucleótidos específicas provistas por el Kit comercial antes mencionado. La secuenciación de las librerías fue llevada a cabo en una plataforma *Illumina HiSeq 2500,* como un servicio subcontratado de Macrogen Inc. (Corea) con una cobertura promedio de 100x. De forma similar, las librerías de WGS fueron construidas con el Kit comercial TruSeq DNA PCR-Free según instrucciones del fabricante, y secuenciadas en la plataforma *Illumina HiSeq 4000*, como un servicio subcontratado de *CentoGene*, (Alemania) con una cobertura promedio mayor a 30x. Todos los procedimientos estandarizados se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.1.4.3. Análisis Bioinformático

Se alineó el producto de las corridas de secuenciación (archivos FASTQ) con la secuencia de referencia del genoma humano del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos versión 37/hg19 utilizando la herramienta BWA (v0.5.9)(43). Posteriormente, se identificaron variantes SNVs y pequeños InDels, mediante la utilización de las herramientas picard (v1.59) y GATK (v3.6) (44) siguiendo las denominadas “mejores prácticas¨. El archivo VCF de salida fue anotado utilizando la herramienta ANNOVAR con información de varias bases de datos como se ha descrito previamente por nuestro grupo en Rodríguez-Quiroga et al (41). Para la priorización de variantes, en primera instancia se construyó un panel multigénico virtual (Anexo 3) a partir de una búsqueda de genes reportados como causantes de ataxias de origen genético en OMIM y HGMD que resultó de utilidad para el análisis e interpretación clínica de los archivos de variantes obtenidos de las corridas de secuenciación. En primer lugar, se consideraron las variantes de los genes incluidos en el panel multigénico virtual, las cuales fueron priorizadas según diversos criterios, como el modo de herencia, la frecuencia poblacional, el posible impacto a nivel molecular y los efectos clínicos reportados. Este proceso fue desarrollado por nuestro grupo y se describe en detalle en Córdoba et al. (45). En caso de no encontrar variantes relevantes en este

panel, se procedió a analizar todos los genes disponibles, más allá de los incluidos en el panel original. Las variantes identificadas fueron clasificadas siguiendo las recomendaciones del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG)(31).

Uniendo la clasificación de variantes y la información de las características clínicas, se clasificó cada estudio NGS como positivo si se identificaba una variante patogénica/probablemente patogénica en el gen conocido de la enfermedad con solapamiento fenotípico y hereditario positivo; indeterminado si se identificaba una variante patogénica/probablemente patogénica en un gen candidato putativo con solapamiento fenotípico y hereditario positivo o sólo se identificaba una variante patogénica/probablemente patogénica con solapamiento fenotípico positivo en un trastorno recesivo y negativo en el resto de los casos. Se realizaron análisis de segregación mediante secuenciación de Sanger para confirmar la herencia de ambos progenitores de los alelos encontrados en heterocigosidad compuesta y homocigosidad en los casos recesivos. En aquellas variantes no reportadas previamente en la literatura y clasificadas como de significado incierto, probablemente patogénicas o patogénicas cuando fue posible se realizó un estudio funcional que permitió identificar el efecto de la variante. En los casos en que no fue posible se utilizaron predictores bioinformáticos y se evaluó el solapamiento con el fenotipo del paciente para determinar el diagnóstico.

3.1.5. Estudio funcional en variantes no reportadas previamente en la literatura

3.1.5.1. Capacidad de reparación del ADN de doble cadena por medio de una rotura inducida por etopósido

En una paciente se identificaron dos variantes en el gen *ATM* que no habían sido previamente reportadas en la literatura científica. Dado que la proteína codificada por este gen está implicada en los mecanismos de reparación del ADN, se realizó un ensayo de daño del ADN en linfocitos inducido por etopósido. Este estudio se realizó en colaboración con la Dra. Marcela González Cid, investigadora de la Academia Nacional de Medicina.

Para realizar el estudio se obtuvieron por venopunción linfocitos de sangre periférica (PBL) heparinizados de la paciente con diagnóstico presuntivo de AT y de un donante sano no fumador y libre de cualquier exposición conocida a agentes genotóxicos. Para cada cultivo, se cultivaron 450 µl de PBL en 4,5 ml de medio RPMI 1640 con 15% de suero bovino fetal, antibióticos y 2% de fitohemaglutinina. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 72 h. Las células se trataron con 0,25, 0,5 o 1,0 g/ml Etopósido (que actúa como veneno para la Topoisomerasa II) durante las últimas 36 h de los cultivos. Se realizó un cultivo de control negativo con DMSO al 0,5%. A las 72 h, se cosecharon los cultivos tras 1 h de exposición a Colcemid 0,1 µg/ml. A continuación, las células se suspendieron en solución hipotónica con KCl 0,075 M durante 28 min y se fijaron en metanol: ácido

acético (3:1). Se prepararon portaobjetos por el método convencional y se tiñeron con Giemsa al 10% durante 4 min. Las roturas e intercambios de cromátidas se analizaron en, cuando fue posible, 50 metafases y el índice mitótico se evaluó en 1000 núcleos interfásicos por tratamiento en dos experimentos independientes.

3.1.5.2. Medición de la actividad de la Tripeptidil peptidasa 1

En un paciente se identificaron variantes en el gen *TPP1* asociado a un caso atípico de CLN2. Para confirmar el hallazgo se midió la actividad enzimática de la Tripeptidil peptidasa 1 en un laboratorio externo a partir de una muestra de sangre periférica.

3.2. Proyecto II (OE2):" Utilización de la secuenciación de tercera generación en el diagnóstico de las ataxias hereditarias"

3.2.1. Aproximación metodológica utilizada

Para cumplir con el OE2, dirigido a explorar el uso de la secuenciación de tercera generación en el diagnóstico y caracterización molecular de las AH causadas por expansiones de TR, se evaluaron tres estrategias diferentes. Todas las estrategias incluyeron la captura de regiones repetitivas de interés y su posterior secuenciación. Se optó por la tecnología de Oxford Nanopore (ONT) debido a su menor costo, portabilidad y el uso de librerías de secuenciación que no requieren fragmentación ni amplificación del ADN durante la preparación.

Las tres estrategias se clasificaron según el método utilizado para la captura de regiones repetitivas (**Figura 9**):

3.2.1.1. Estrategia 1: Captura mediante el sistema CRISPR-Cas

Se exploró un enfoque basado en los sistemas CRISPR-Cas9 y CRISPR/dCas9. Esta estrategia permite capturar regiones específicas del ADN utilizando ARN guía (ARNg) diseñados para cortar el ADNdc antes y después de la región de interés. Para superar la necesidad de altas concentraciones de ADN, se desarrolló un método que combina CRISPR-Cas9 o CRISPR/dCas9 con amplificación de círculo rodante (RCA).

El proceso implica: a) Captura específica de regiones de interés utilizando dCas9 o Cas9. b) Aislamiento de las regiones capturadas mediante perlas magnéticas. c) Formación de un templado de ADN circular de simple cadena. d) Amplificación mediante RCA.

La correcta captura se evaluó inicialmente mediante NGS, aunque la compatibilidad con ONT resultó limitada en nuestra experiencia.

3.2.1.2. Estrategia 2: Construcción de un panel de genes asociados a TR mediante PCR

Se construyó un panel genético utilizando productos de PCR que fueron secuenciados simultáneamente mediante ONT. Este panel se diseñó específicamente para analizar los genes asociados con las formas más comunes de AH causadas por expansiones TR, incluyendo SCA1, SCA2, SCA3, SCA17, EH y AF.

3.2.1.3. Estrategia 3: Construcción de un panel de genes asociados a TR mediante muestreo adaptativo

Esta estrategia se basó en el uso de una metodología innovadora conocida como "muestreo adaptativo", que permite crear un panel virtual y personalizado para la secuenciación en tiempo real. Esta metodología fue seleccionada por las siguientes razones:

1. Direccionamiento específico: El muestreo adaptativo permite dirigir la secuenciación hacia regiones genómicas de interés en tiempo real, sin necesidad de preparar físicamente un panel de genes.

2. Eliminación de pasos de captura: A diferencia de los métodos tradicionales, esta técnica de enriquecimiento es libre de pasos de amplificación y/o hibridación de sondas , lo que elimina la necesidad de realizar procesos de captura en la muestra de ADN durante la construcción de la librería. Esto simplifica significativamente el protocolo de preparación de muestras, sobre todo en regiones TR, que son difíciles de capturar con métodos tradicionales.

3. Flexibilidad y personalización: Permite crear paneles "virtuales" que pueden ser fácilmente modificados o actualizados sin cambiar el protocolo de preparación de la muestra.

4. Compatibilidad con secuenciación de lectura larga: El muestreo adaptativo se integra bien con la tecnología de Oxford Nanopore, permitiendo la secuenciación de fragmentos largos de ADN, crucial para el estudio de TR.

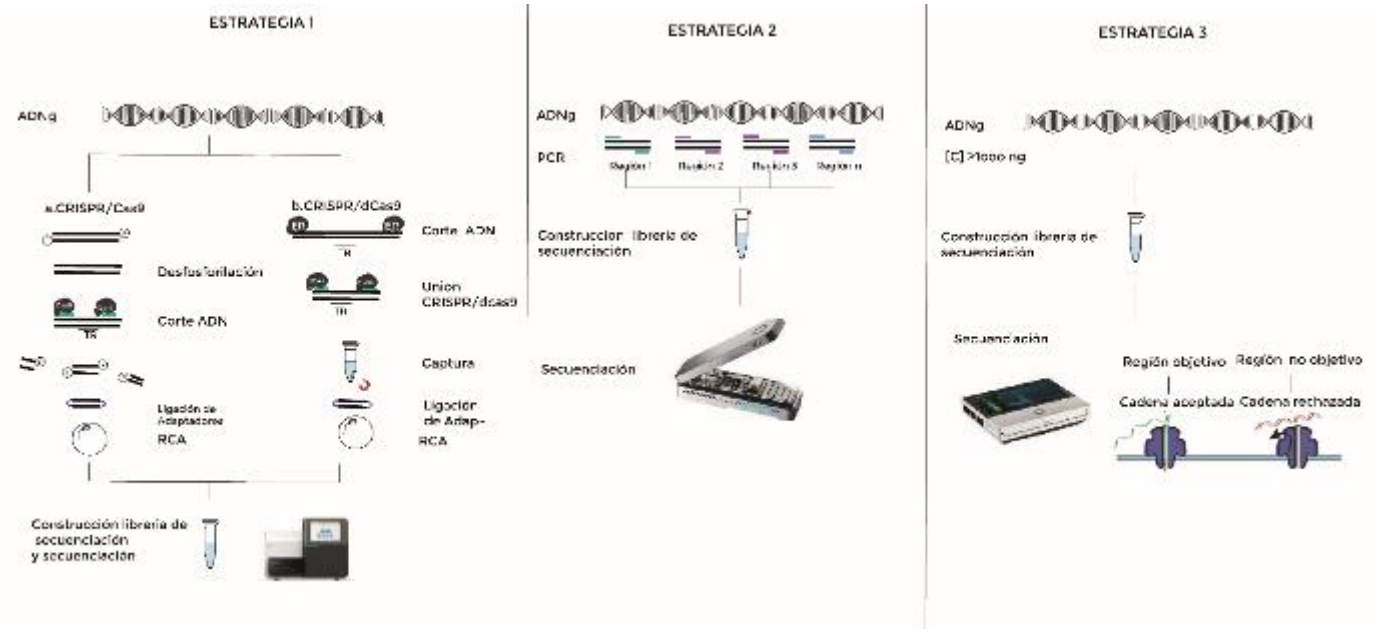


Figura 9. Estrategias utilizadas para el estudio de regiones etiopatogénicas asociadas a las ataxias hereditarias causadas por la expansión de regiones repetidas en tándem *En la estrategia 1, la captura de la región de interés implicó el uso del sistema CRISPR/Cas9 o CRISPR/dCas9 y RCA. En las estrategias 2 y 3, se diseñaron paneles de genes y se secuenciaron utilizando tecnologías de ONT. Mientras que en la estrategia 2, el panel de genes se construyó mediante PCR, en la estrategia 3, el panel de genes fue virtual, utilizando muestreo adaptativo que acepta o rechaza las cadenas a secuenciar según si pertenecen o no a las regiones de interés cargadas en el panel virtual, permitiendo así el uso de ADN nativo en esta última estrategia.* ***TR****: repetición en tándem*

3.2.2. Pacientes

Para las estrategias 1 y 2, se seleccionaron pacientes con un diagnóstico molecular confirmado de subtipos de AH causados por expansión de TR (como AF, SCA3, EH). También se incluyeron pacientes con un cuadro clínico atípicos o con estudios genéticos previos que justificaran un análisis detallado de las regiones de TR (como una familia con SCA3, un paciente con SCA48 y posible herencia digénica). Todos los participantes adultos y los progenitores de los pacientes pediátricos otorgaron su consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por el comité ético institucional del Hospital JM Ramos Mejía (**Anexo 1**).

Para la estrategia 3, se utilizó la muestra de un paciente del Departamento de Neurología y Medicina de Rehabilitación de la Universidad de Cincinnati con diagnóstico de Ataxia Episódica, como control "normal" por no presentar alelos expandidos en las regiones analizadas. Este protocolo fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Cincinnati (IRB#2022-0543).

Estas estrategias buscan explorar e identificar enfoques que faciliten y mejoren el análisis de regiones TR en comparación con las metodologías comúnmente utilizadas en la práctica clínica habitual, como el análisis de fragmentos descripto en el proyecto I. La selección de estas estrategias, particularmente la tercera, se basó en los avances tecnológicos ocurridos durante el desarrollo de la tesis doctoral.

3.2.3. Procedimiento

3.2.3.1. Toma de muestra y extracción de ADN

Toma de muestra

Tras la firma del consentimiento informado se obtuvieron de cada paciente dos mililitros de sangre total mediante venopunción en tubos anticoagulados con EDTA y se preservaron a -20 C° hasta su utilización

Extracción de ADN

Estrategia 1 y 2

Se purificó el ADN genómico total utilizando el kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen siguiendo el protocolo detallado a continuación

1.Se colocaron 20 µl de Proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y consecutivamente se agregaron 200 µl de sangre entera periférica. Se agregó una cantidad equivalente de buffer AL a la muestra y se mezcló por vortex durante 15 segundos.

2. Se incubó durante 10 minutos a 56°C, mezclando paulatinamente para asegurar la lisis celular.

3. Se centrifugó brevemente y se agregaron 200 µl de etanol absoluto a la muestra y se volvió a mezclar por vortex.

4. Se trasvasó el contenido del tubo a una columna QIAamp Mini spin column y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.

5. Se descartó el eluido y se agregaron 500 µl del buffer AW1 a la columna. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.

6. Nuevamente se descartó el eluido y se agregaron 500 µl de buffer AW2 a la columna. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.

7. Para asegurar que todo el buffer AW2 se eliminó de la columna, se descartó el eluido y se secó la columna centrifugando a 14000 rpm durante 1 minuto.

8. Se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se agregaron 100 µl de buffer AE para eluir el ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y se centrifugó la columna a 8000 rpm durante 1 minuto.

9.Se descartó la columna y se procedió a evaluar la calidad del ADN extraído

Estrategia 3

La muestra de ADN se obtuvo utilizando el método automatizado de extracción de ADN por precipitación Flex STAR+ (Autogen) en el Biobanco "Discover Together" del Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati - CCHMC.

Calidad de la muestra de ADN

Luego de completar la extracción de ADN, se procedió a evaluar la integridad de la muestra mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1,5 % y su posterior visualización en un transiluminador de luz Uv Al mismo tiempo, se cuantificó su concentración (en ng/uL) utilizando el fluorómetro Quantus™ Fluorometer de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante.

Banco de ADN

El ADN extraído fue conservado en freezer a -20 C. Cada una de las muestras fue rotulada y clasificada con código anonimizado.

3.2.3.2. Captura de regiones de interés y construcción de librerías de secuenciación

3.2.3.2.1. Estrategia 1: Captura mediante el sistema CRISPR-Cas

Captura de la región de interés

Sistema CRISPR-dCas9

Este procedimiento incluyó varios pasos descritos a continuación:

a. Corte con enzimas de restricción

Se fragmentaron 24 µL de ADN genómico (ADNg) utilizando las enzimas de restricción HF-BAMHI (catálogo n° R3136, NEB) y BsiHKAI (catálogo n° R0570, NEB). Para este fin, se agregaron 5 µL de Buffer CutSmart 10X, 5 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de la enzima HF-BAMHI (20,000 U/mL) y 2 µL de la enzima BsiHKAI (10,000 U/mL). La reacción se llevó a cabo durante 15 minutos a 37°C, seguidos de 15 minutos a 65°C y, finalmente, 5 minutos a 80°C para inactivar las

endonucleasas. La eficacia del corte se evaluó mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1%.

b. Captura con dCas9

Se diseñaron tres ARNg específicos para dirigirse a la región repetitiva GAA del intrón 1 del gen FXN utilizando la plataforma gratuita Chop-chop (https://chopchop.cbu.uib.no/)(**Tabla 8**). Los ARN guía se adquirieron liofilizados en Synthego y posteriormente se reconstituyeron a una concentración de 100 µM en buffer TE (1X), siendo luego diluidos en agua libre de nucleasas para alcanzar una concentración final de 1 µM.

Para evaluar su funcionalidad, se analizó la capacidad de corte sobre un producto de amplificación de PCR que contenía la región de interés del intrón 1 del gen *FXN*, siguiendo un procedimiento estándar de corte con Cas9 Nuclease, S. pyogenes (catálogo n° M0386S, NEB). Se diseñaron dos pares de cebadores que generaron los fragmentos 1 y 2 del intrón 1 (**Figura 10, Tabla 8**). El fragmento 1 fue clivado con los ARNg dirigidos a la región rio arriba de la repetición GAA, y el fragmento 2 fue clivado con el ARNg dirigido a la región rio abajo de la repetición GAA. Los resultados se evaluaron mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5%.

Una vez confirmada la funcionalidad de los ARNg, se procedió a la captura del intrón 1. Se realizó con un pre-ensamblaje de dichos ARNg con la enzima EnGen® Spy dCas9 (SNAP-tag®) (número de catálogo M0652S de NEB). Para ello se combinaron en un tubo libre de nucleasas 2.5 µL de cada ARN guía (1 µM), 2.5 µL de EnGen® Spy dCas9 (SNAP-tag®) (1 µM), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 2.5 µL de buffer CutSmart (10X, NEB). Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C para permitir la formación de los complejos Cas9/ARNg, los cuales luego se incubaron con 20 µL del producto obtenido en el paso a durante 40 minutos a 37°C.

Posteriormente, el ADN se mezcló con las Magnetic Beads SNAP-Capture (número de catálogo S9145, NEB) en igual volumen durante una hora a temperatura ambiente. Estas perlas poseen afinidad por el SNAP-tag® de la enzima dCas9. Las perlas unidas al ADN conjugado con dCas9 fueron lavadas y el material genético fue eluido para su posterior procesamiento.

c. Reparación del ADN

Se procedió a reparar el ADN utilizando el Módulo NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing (número de catálogo E7546S, NEB). En este paso, se combinaron 1.5 µL de NEBNext Ultra II End

Prep Enzyme Mix, 3.5 µL de NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer (10X) y 25 µL del producto de corte generado mediante CRISPR/Cas9.

d. Ligación de adaptadores

Los extremos reparados del ADN fueron ligados a adaptadores utilizando el módulo NEBNext® Ultra™ II Ligation Module (número de catálogo E7595, NEB). Para ello, se mezclaron 10 µL de NEBNext Ultra II Ligation Master Mix, 1.3 µL de NEBNext Ligation Enhancer, 0.83 µL de NEBNext Adaptor for Illumina y 20 µL del templado de ADN obtenido tras la reparación. Los adaptadores empleados son específicos de este módulo y facilitan la formación de una horquilla que permite la generación de un molde circular de ADN de simple cadena.

e. Amplificación mediante RCA

Se amplificó el molde de ADN circular mediante RCA, empleando 1 µL de Phi29 DNA polymerase (10,000 U/µL, número de catálogo M0269S de NEB), 2.5 µL de hexámeros exoresistentes, 2.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.25 µL de BSA (20 mg/ml, número de catálogo B9200S NEB), 28.75 µL de agua libre de nucleasas y 20 µL del ADN capturado y ligado a adaptadores. La reacción se incubó a 37°C durante 10 a 16 horas en un termociclador. El producto de amplificación se visualizó mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%.

f. Verificación preliminar de la captura

Con el objetivo de determinar si la región del intrón 1 del gen *FXN* se encontraba enriquecida en comparación con el resto del ADN genómico y mitocondrial, se llevó a cabo un análisis mediante una reacción de PCR en tiempo real. Para ello, se utilizó el kit QuantiFast SYBR® Green RT-PCR de Qiagen.

En primer lugar, se diseñaron cebadores específicos utilizando la herramienta Primer-Blast para amplificar la región capturada del intrón 1 del gen *FXN* (**Tabla 8**). Asimismo, se emplearon cebadores de uso común en el laboratorio, dirigidos al ADN mitocondrial y nuclear, para amplificar las regiones de control correspondientes.

La mezcla de reacción se preparó combinando 5 µL de la solución 2x QuantiFast SYBR, 0.2 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM, 2.4 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL del producto de amplificación obtenido mediante RCA.

El ciclo de PCR se realizó en el equipo Stratagene Mx3000P® qPCR System, iniciando con una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos que consistieron en una etapa de desnaturalización a 95°C por 10 segundos y una etapa combinada de *annealing* y extensión a 60°C durante 30 segundos. Se evaluaron los valores de ciclo umbral (CT) obtenidos para cada secuencia objetivo. Se esperaba que el fragmento correspondiente al gen *FXN* exhibiera un valor de

CT meno en comparación con los controles, lo cual indicaría un enriquecimiento específico de esa región. Este resultado permitiría proceder con la construcción de las librerías de secuenciación correspondientes.

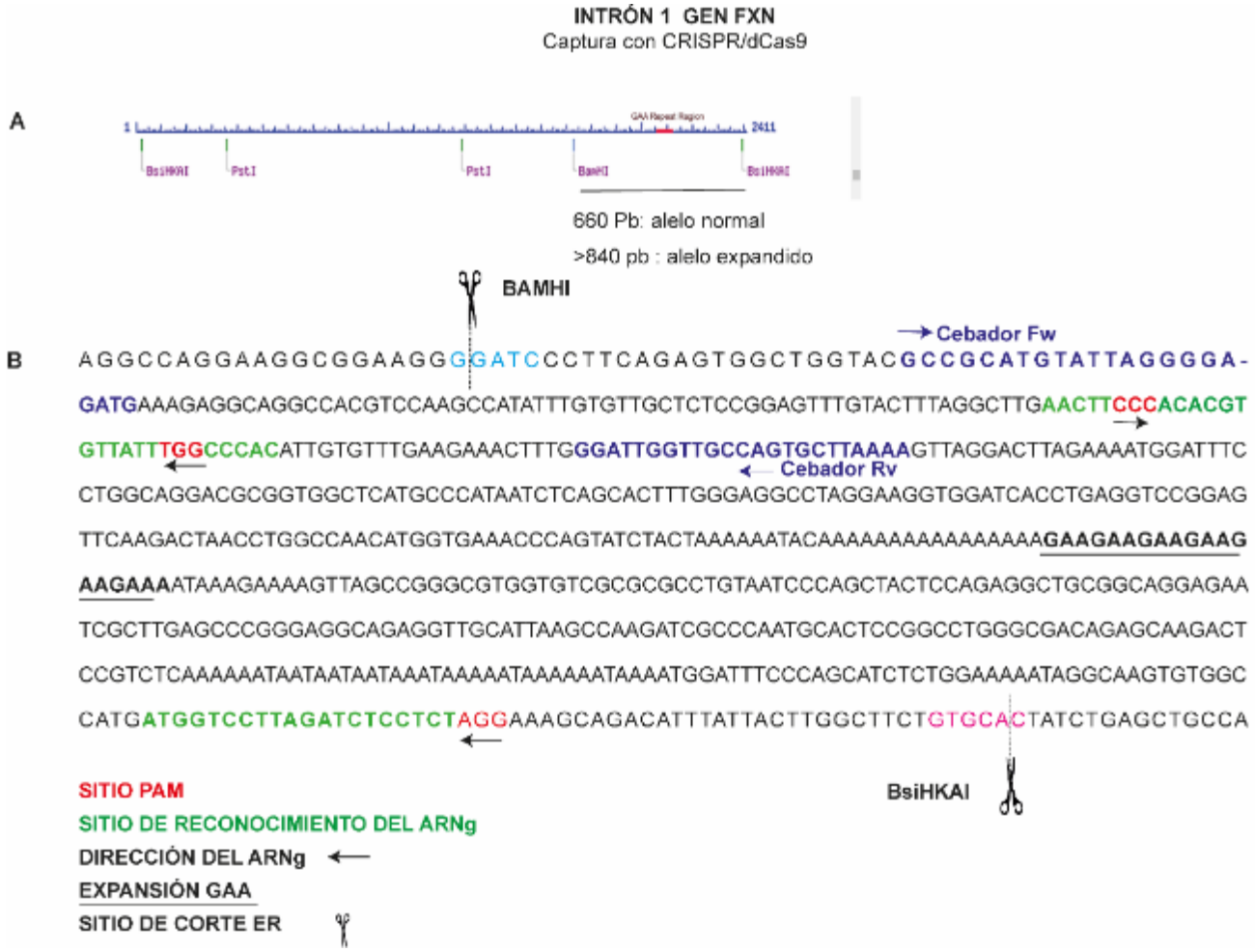


Figura 10. Captura del intrón 1 del gen FXN mediante el sistema CRISPR/dcas9*. La figura A muestra el tamaño esperado tras el corte con enzimas de restricción. En la imagen B se detalla la región del intrón donde hibridan los diferentes oligos utilizados y donde se genera el corte por la enzima de restricción*

Sistema CRISPR-Cas9

a. Desfosforilación del ADN

Se mezclaron 24 µL de ADNg con 3 µL de Buffer CutSmart™ (10X) y 3µL de Quick CIP (5,000 units/ml, catalogo n° M0525S, NEB). La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos y luego se inactivó a 80°C durante 2 minutos.

b. Corte del fragmento de interés con el sistema Crispr/Cas9

Al igual que en el método con dCas9, se utilizaron los tres ARNg específicos diseñados para dirigirse a la región repetitiva GAA del intrón 1 del gen FXN (**Tabla 8).**

Una vez confirmada la funcionalidad de los ARNg, se procedió a la captura del intrón 1 (**Figura 11).** Se realizó un pre-ensamblaje de los ARNg y la enzima Cas9 Nuclease, S. pyogenes (catálogo n° M0386S, NEB). En un tubo libre de nucleasas, se combinaron 2.5 µL de cada ARN guía (0,4 µM), 2.5 µL de Cas9 Nuclease, S. pyogenes (1 µM), 2.5 µL de agua libre de nucleasas, y 2.5 µL de buffer CutSmart (10X, NEB). Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C para permitir la formación de los complejos Cas9/ARNg, que luego se incubaron con 20 µL de ADN genómico desfosforilado durante 40 minutos a 37°C. Finalmente, la reacción se trató con proteinasa K para inactivar la nucleasa.

c. Reparación del ADN

Este paso se realizó de manera idéntica al método con dCas9, utilizando el Módulo NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing (número de catálogo E7546S, NEB).

d. Ligación de adaptadores

La ligación de adaptadores se llevó a cabo de la misma manera que en el método con dCas9, empleando el módulo NEBNext® Ultra™ II Ligation Module (número de catálogo E7595, NEB).

e. Amplificación mediante RCA

La amplificación por RCA se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el método con dCas9, utilizando la Phi29 DNA polymerase (10,000 U/µL, número de catálogo M0269S de NEB).

f. Verificación preliminar de la captura

La verificación preliminar de la captura se llevó a cabo de manera similar al método con dCas9. Se realizó un análisis mediante PCR en tiempo real utilizando el kit QuantiFast SYBR® Green RT-PCR de Qiagen. Para este fin, se emplearon los cebadores específicos diseñados para amplificar la región capturada del intrón 1 del gen FXN con CRISPR/Cas9 detallados en la **Tabla 8**, así como los cebadores de control dirigidos al ADN mitocondrial y nuclear. Este proceso permitió determinar si la región del intrón 1 del gen FXN se encontraba enriquecida en comparación con el resto del ADN

genómico y mitocondrial, utilizando los mismos parámetros y equipos descritos anteriormente para el método con dCas9.

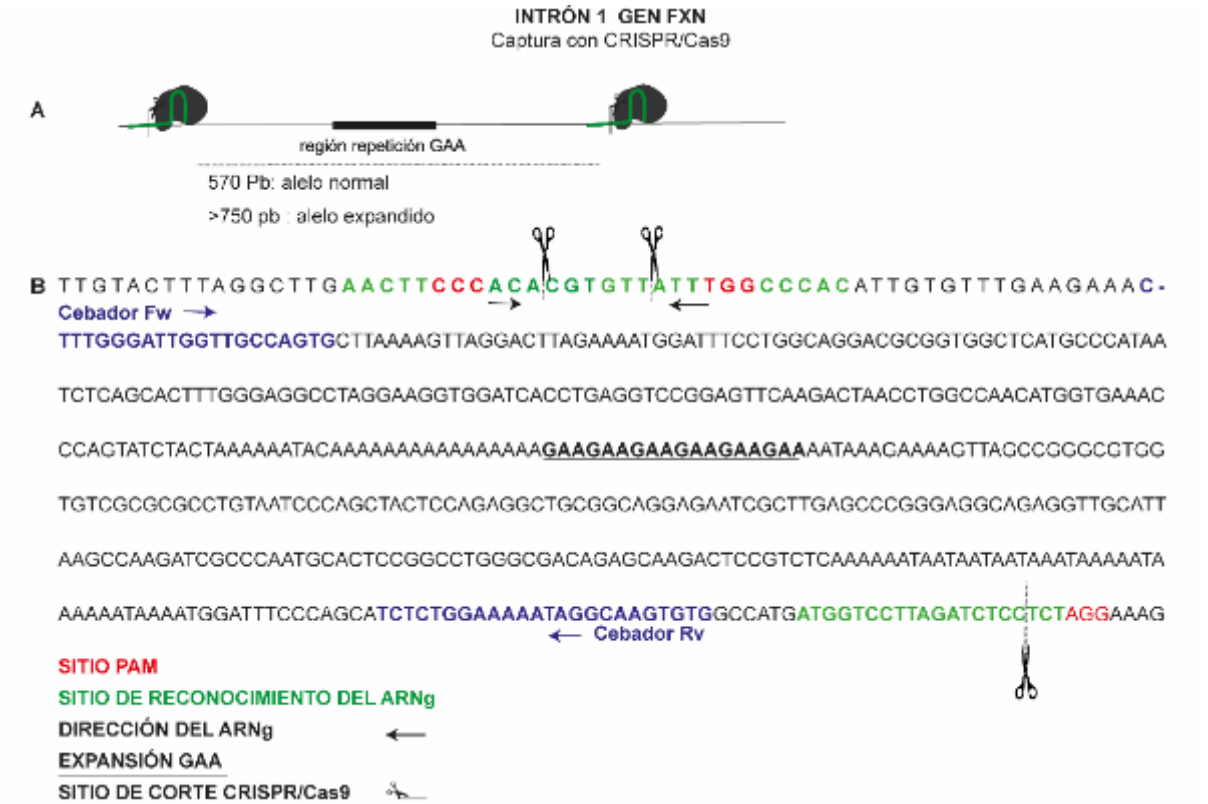


Figura 11. Captura del intrón 1 del gen FXN mediante el sistema CRISPR/Cas9. *La figura A muestra el tamaño esperado tras el corte de la enzima Cas9. En la imagen B se detalla la región del intrón donde hibridan los diferentes oligos utilizados y donde se genera el corte por el sistema CRISPR/Cas9.*

Construcción de librerías y secuenciación mediante NGS

Se utilizó el producto de amplificación generado mediante RCA como molde para la preparación de la librería de secuenciación utilizando el NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (número de catálogo E7645S, NEB). Se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante, el cual incluyó la fragmentación del producto de RCA, la reparación de extremos del ADN, la adición de adaptadores indexados y la amplificación por PCR para enriquecer los fragmentos de ADN con adaptadores ligados. Posteriormente, se cuantificó la librería resultante y se evaluó su tamaño mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, siendo visualizado en un transiluminador UV para confirmar su adecuado procesamiento. Finalmente, la librería se sometió a secuenciación en un equipo HiSeq, utilizando los servicios de Macrogen como proveedor de secuenciación de nueva generación (NGS).

Tabla 8. oligonucleótidos utilizados en la estrategia 1. ARNg: *ARN guía****, Fw:*** *forward****, Rv:*** *reverse.*

Nombre	Secuencia (5´-3¨)	Información adicional
ARNg 1	GUGGGCCAAAUAACACGUGUGUUUUAGAGCUAGA	Rio arriba GAA
ARNg 2	AACUUCCCACACGUGUUAUUGUUUUAGAGCUAGA	Rio arriba GAA
ARNg 3	AUGGUCCUUAGAUCUCCUCUGUUUUAGAGCUAGA	Rio abajo GAA
FXN-Intron1 Fw	GCCGCATGTATTAGGGGAGATG	Captura CRISPR/dCas9 157 pb.
FXN-Intron1 Rv	TTTTAAGCACTGGCAACCAATCC	
FXN-Intron1 Fw2	CTTTGGGATTGGTTGCCAGTG	Captura CRISPR/Cas9 452 pb
FXN-Intron1 Rv2	CACACTTGCCTATTTTTCCAGAGA	
FXN-Intron1 Fw3	TTACGCCACGGCTTGAAAGG	Funcionalidad ARNg Fragmento 1 774 pb
FXN-Intron1 Rv3	CACACTTGCCTATTTTTCCAGAGA	
FXN-Intron1 Fw4	CTTTGGGATTGGTTGCCAGTG	Funcionalidad ARNg Fragmento 2 905 pb
FXN-Intron1 Rv4	ACCACCTCTTGTCATTCTCCT	

3.2.3.2.2. Estrategia 2: Construcción de un panel de genes asociados a TR mediante PCR

Captura de las regiones de interés

Para cada paciente seleccionado, se realizó una reacción de PCR con el propósito de amplificar la región de ADN asociada a su subtipo específico de AH.

La reacción de PCR para los genes *ATXN1, ATXN2, ATXN3, HTT* y *TBP* se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL, siguiendo el protocolo detallado a continuación: 37.2 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de Colorless GoTaq® Reaction Buffer (5X), 0.2 µL de GoTaq DNA polimerasa (5u/µl), 0.3 µL de cada cebador *forward y reverse* (100 µM) y 2 µL de ADN genómico como molde. En algunos casos, se añadieron 3% (v/v) de DMSO (**consultar Tabla 9**).

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador Veriti™ 96 Well, con las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a la temperatura de alineamiento (Ta) (**ver Tabla 9**) y

30 segundos a 72 °C, finalizando con un paso de extensión de 5 minutos a 72 °C. Se incluyeron controles negativos sin molde (NTC) en cada ciclo de amplificación.

Para la reacción de *Long Range* PCR del intrón 1 del gen *FXN*, se utilizó la Q5® High-Fidelity 2X Master Mix n° de catálogo M0492, NEB). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL, siguiendo el siguiente protocolo: 13 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de Q5® High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µL de cada cebador forward y reverse (10 µM) y 2 µL de ADN genómico como molde.

Las amplificaciones se realizaron utilizando un termociclador Veriti™ 96 Well. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 60 segundos a 98 °C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 62 °C y 2 minutos y 30 segundos a 72 °C, finalizando con un paso de extensión de 2 minutos a 72 °C. En cada ciclo de amplificación se incluyeron controles negativos sin molde (NTC) para verificar la ausencia de contaminación.

La presencia del producto de amplificación esperado se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE (1X), con la adición de 3 µL de GelGreen para la visualización en un transiluminador de luz LED. Posteriormente, se cuantificó la concentración de los productos de PCR (en ng/µL) utilizando el fluorómetro Quantus™ Fluorometer de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras esta cuantificación, se procedió a la construcción de las librerías de secuenciación.

Tabla 9. Cebadores utilizados para las reacciones de PCR y Long Range PCR en las diferentes ataxias causadas por expansión de secuencias repetitivas EH*: Enfermedad de Huntington.* ***SCA****: ataxia espinocerebelosa,* ***AF****: ataxia de Friedreich. Ta: temperatura de annealing. pb: pares de bases,* ***Fw****: forward,* ***Rv****: reverse* ***N/A:*** *No aplica****. **** El tamaño esperado del producto de amplificación corresponde a los alelos que se encuentran dentro del rango normal de TR, de acuerdo con la secuencia de ADN disponible en bases de datos como Ensembl.*

Ataxia	Gen	Exón/Intrón	Cebador	Secuencia ADN (5´-3´)	Ta (°C)	Aditivo	Tamaño esperado (pb)*
SCA 1	*ATXN1*	Exón 8	Fw	AACTGGAAATGTGGACGTAC	57	N/A	212
			Rv	CAACATGGGCAGTCTGAG			
SCA2	*ATXN2*	Exón 1	Fw	CGTGCGAGCCGGTGTATGGG	66	DMSO	172
			Rv	GGCGACGCTAGAAGGCCGCT			
SCA3	*ATXN3*	Exón 10	Fw	CCAGTGACTACTTTGATTCGTGA	60	N/A	205
			Rv	GGCTGGCCTTTCACATGGAT			
SCA17	*TBP*	Exón 3	Fw	CCTTATGGCACTGGACTGAC	61	N/A	245
			Rv	GTTCCCTGTGTTGCCTGCTG			
EH	*HTT*	Exón 1	Fw	CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT	63	DMSO	160
			Rv	CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC			
AF	*FXN*	Intrón 1	Fw	GGAGGGATCCGTCTGGGCAAAGG	66	N/A	468
			Rv	CAATCCAGGACAGTCAGGGCTTT			

Construcción de librerías de secuenciación.

Las librerías de secuenciación se construyeron utilizando el "Ligation Sequencing Kit" (n.º de catálogo SQK-LSK109, ONT), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el protocolo del fabricante para “Ligation Sequencing Amplicon” (disponible en https://community.nanoporetech.com/protocols/amplicon-sqk-lsk109/v). Dado que este protocolo está diseñado originalmente para procesar un solo producto de amplificación a la vez, se adaptó para utilizar un conjunto o pool de amplicones como material inicial, con el propósito de construir un panel que permita analizar múltiples regiones simultáneamente.

Para generar estos pools, los amplicones obtenidos tras la reacción de PCR descrita anteriormente se ajustaron a una concentración similar y se agruparon en un volumen de 47 µL.

Cada agrupación o pool contuvo 200 fmol de cada producto de PCR y comprendió al menos tres regiones de interés diferentes.

Cada pool se utilizó entonces como material de partida para construcción de la librería de secuenciación. En primer lugar, las secuencias de ADN que compusieron cada pool se prepararon para la ligación de los adaptadores. Para ello, se utilizó el Módulo NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module (n.° de catálogo E7546, NEB) para reparar el ADN y agregar colas de dA. Los amplicones con colas dA fueron luego ligados a adaptadores en un volumen total de reacción de 100 µL, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, esta mezcla de reacción fue purificada utilizando perlas Agencourt AMPure XP (n.º de catálogo A63880, Beckman Coulter Inc.), lavada con buffer de fragmentos cortos y eluida en buffer de elución en un volumen final de 15 µL, utilizando los reactivos suministrados por ONT.

La librería se cuantificó utilizando el fluorómetro Quantus de Promega. Si la concentración obtenida fue suficiente para la secuenciación (superior a 5 fmol), se combinaron 12 µL de la librería (o el volumen necesario que no superara los 50 fmol) con el buffer y las perlas suministradas por ONT en un volumen final de 75 µL. Posteriormente, esta mezcla se cargó en la célula de flujo FLO-MIN106D, R9.4.1 para la secuenciación en el MinION Mk1B. Las muestras se corrieron durante 3 horas o hasta alcanzar la cantidad de lecturas deseada, según lo especificado en tiempo real en el software MinKnow de Oxford Nanopore. Posteriormente, las celdas de flujo fueron lavadas de nucleasas del Flow Cell Wash Kit (n.º de catálogo WSH004, ONT) y reutilizadas.

3.2.3.2.3. Estrategia 3: Construcción de un panel de genes asociados a TR mediante muestreo adaptativo

Construcción de librerías de secuenciación

Se emplearon 2 µg de ADNg no fragmentado y purificado del paciente para la preparación de librerías de secuenciación utilizando el kit de secuenciación por ligación de Oxford Nanopore (n.º de catálogo SQK-LSK110, ONT), siguiendo las instrucciones del protocolo “Ligation sequencing gDNA” proporcionado por el fabricante. En resumen, el ADN fue preparado para la ligación de adaptadores utilizando el Módulo Para ello, se utilizó el Módulo NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module (n° de catálogo E7546, NEB) para reparar el ADN y agregar colas de dA. Posteriormente, el ADN con colas dA fue ligado a adaptadores en un volumen total de reacción de 100 µL, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego a 37°C por otros 5 minutos. La mezcla de reacción resultante fue purificada utilizando perlas Agencourt AMPure XP (n.º de catálogo A63880, Beckman Coulter Inc), lavada con buffer de fragmentos largos y eluida en buffer de elución en un volumen final de 15 µL, utilizando los reactivos suministrados por ONT. La concentración de la librería fue cuantificada utilizando el fluorómetro Quantus de Promega, obteniendo una concentración aproximada de 170 ng/uL (equivalente a aproximadamente 161 fmol). Se cargaron 6 uL de la librería

en una celda de flujo (FLO-MIN106D, R9.4.1) en un secuenciador MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies) durante 72 horas, con una carga adicional del volumen restante de la librería a las 24 horas de corrida después del lavado de la célula de flujo con nucleasas utilizando el Kit de lavado de celdas de flujo (n° de catálogo EXP-WSH004, ONT).

Las regiones de interés fueron enriquecidas mediante la función de muestreo adaptativo del software MinKnow del MinION Mk1C, que se configuró utilizando un archivo BED (**ver Tabla 10**). Este archivo asignó la posición genómica para cada locus de interés, junto con una región circundante de 100 kb. El panel incluyó genes asociados a varios subtipos de AH y al temblor esencial, generadas tanto por expansiones de TR como por SNVs e InDels pequeñas. Se utilizó el Genoma de Referencia del Consorcio Humano Build 38 (GRCh38) como el genoma de referencia.

Tabla 10. Coordenadas genómicas empleadas para la creación del archivo BED utilizado en el muestreo adaptativo (Estrategia 3). pb*: pares de bases*

Cromosoma	Izquierda	Derecha	Gen	Tamaño (pb)
1	56944778	58596734	*DAB1*	1651956
1	149340621	149521833	*NOTCH2NLC*	181212
1	110100494	110252202	*SLC6A17*	151708
1	109259568	109447918	*SORT1*	188350
2	74479596	74583350	*HTRA2*	103754
2	96134859	96258827	*STARD7*	123968
3	63813155	64053462	*ATXN7*	240307
3	114077580	114249407	*DRD3*	171827
3	38795764	39102157	*SCN11A*	306393
3	183647797	183862624	*YEATS2*	214827
4	2991363	3293957	*HTT*	302594
4	159053013	159410174	*RAPGEF2*	357161
4	39237456	39416375	*RFC1*	178919
4	52540960	52709301	*USP46*	168341
5	146463144	146566190	*GPR151*	103046
5	10303695	10490388	*MARCHF6*	186693
5	146530742	147134784	*PPP2R2B*	604042
5	168611733	169351139	*SLIT3*	739406
6	16249112	16811491	*ATXN1*	562379
6	170504302	170622870	*TBP*	118568
7	150941017	151064588	*NOS3*	123571
8	98376958	98482853	*KCNS2*	105895
8	118139455	118672112	*SAMD12*	532657
9	136746338	136857741	*CCDC183*	111403
9	68985751	69129076	*FXN*	143325
9	27485640	27623866	*C9orf72*	138226
11	102720502	102830628	*MMP10*	110126

11	78602829	79491030	*TENM4*	888201
12	6874463	6992321	*ATN1*	117858
12	111393485	111649676	*ATXN2*	256191
12	101518353	101736028	*MYBPC1*	217675
13	101660804	102452457	*FGF14*	791653
14	91994496	92156621	*ATXN3*	162125
16	630410	732801	*STUB1*	102391
16	66377295	66543529	*BEAN1*	166234
16	31130138	31241605	*FUS*	111467
16	24560209	24877632	*TNRC6A*	317423
17	50510715	50677474	*CACNA1G*	166759
17	63888554	64022918	*SCN4A*	134364
19	19204756	19312804	*HAPLN4*	108048
19	13156442	13683025	*ATXN8OS*	526583
19	13156442	13683025	*CACNA1A*	526583
20	2602593	2708393	*NOP56*	105800
22	45621798	45895307	*ATXN10*	273509
X	147861919	148001125	*FMR1*	139206
X	71316222	71582374	*TAF1*	266152

3.2.3.3. Análisis bioinformático

3.2.3.3.1. Estrategia 1: Captura mediante el sistema CRISPR/cas9 o CRISPR/dcas9

Se realizó la alineación de los archivos FASTQ, obtenidos de las corridas de secuenciación, con la secuencia de referencia del genoma humano GRCh38 utilizando la herramienta BWA (v0.5.9). Una vez completado este proceso, el archivo SAM resultante fue convertido en un archivo BAM ordenado e indexado mediante la herramienta Samtools. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de la captura visualizando este archivo BAM mediante IGV (Integrative Genomics Viewer). El archivo BAM contiene las secuencias alineadas de las corridas de secuenciación, lo que facilita la identificación y caracterización de las regiones de interés capturadas durante el experimento.

3.2.3.3.2. Estrategia 2: Secuenciación de un panel de genes generado por PCR mediante Oxford Nanopore Technologies

Los archivos FAST5 obtenidos tras la secuenciación se procesaron utilizando Guppy (v5.0.11) para convertirlos en archivos FASTQ. Las lecturas resultantes se alinearon a la secuencia de referencia GRCh38 utilizando minimap2 (v2.22) (46), generando un archivo BAM. Este archivo BAM fue sometido a un proceso de control de calidad que incluyó la evaluación de la cobertura de secuenciación y las estadísticas de alineamiento de lecturas.

El análisis de caracterización de las secuencias TR se inició con los archivos FASTQ obtenidos de la secuenciación. Para asegurar una representación adecuada de cada región secuenciada, se seleccionaron un mínimo de 10 lecturas por región. Las lecturas seleccionadas se sometieron a un alineamiento múltiple utilizando el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Como referencia para el alineamiento, se incluyó el fragmento correspondiente del genoma humano GRCh38, lo que permitió una comparación directa con la secuencia de referencia estándar. A partir del alineamiento resultante, las lecturas se clasificaron y agruparon según su tamaño estimado. Basándose en estos grupos, se definieron dos secuencias consenso, cada una representando un alelo potencial. Utilizando estas secuencias consenso como base, se procedió a evaluar la presencia de secuencias interruptoras. Finalmente, para estimar el tamaño de la expansión de TR, se empleó la herramienta especializada 'Tandem Repeat Finder'(47)(disponible en https://tandem.bu.edu/). Esta herramienta utiliza algoritmos avanzados para detectar y caracterizar repeticiones en tándem en secuencias de DNA, proporcionando una estimación confiable del tamaño de la expansión.

3.2.3.3.3. Estrategia 3: Construcción de un panel de genes asociados a TR mediante muestreo adaptativo

Para el análisis bioinformático, se implementó el flujo de trabajo "wf-human-variation" de Nextflow, disponible públicamente en GitHub y en la aplicación EPI2ME(ONT). Este flujo de trabajo ofrece una amplia capacidad para analizar las variaciones en datos genómicos humanos incluyendo el genotipado de expansiones de TR.

El proceso de análisis comenzó con el preprocesamiento de los datos crudos obtenidos de la secuenciación. Los archivos FAST5 iniciales se convirtieron a formato POD5, y posteriormente se utilizó la herramienta Dorado (ONT) para generar archivos FASTQ a partir de estos. Las lecturas resultantes se alinearon a la secuencia de referencia GRCh38 utilizando minimap2 (46), generando un archivo BAM que fue sometido a un proceso de control de calidad que incluyó la evaluación de la cobertura de secuenciación y las estadísticas de alineamiento de lecturas

El archivo BAM junto con el genoma humano de referencia GRCh38 y un archivo BED con las coordenadas de las regiones de interés (**Tabla 10**), se utilizaron como datos de entrada para el flujo de trabajo "wf-human-variation" (Nextflow,ONT). El llamado de variantes pequeñas se realizó mediante Clair3 (v1.0.4)(48), que permite la identificación de variantes genéticas germinales, como SNVs e InDels. Para la identificación de variantes estructurales, se utilizó Sniffles2(49), que incluye la llamada, filtrado y generación de informes sobre las variantes estructurales detectadas. Además, se implementaron procesos para la llamada de variantes de número de copias utilizando modkit y QDNASeq. Finalmente, la genotipificación de TR se llevó a cabo utilizando Straglr(50). El flujo de trabajo también incluyó la fase de anotación de variantes, que se automatizó para SNVs y SVs

utilizando SnpEff y anotaciones de ClinVar(51). Estas anotaciones proporcionan información adicional sobre la relevancia clínica de las variantes identificadas.

4. RESULTADOS

4.1. Proyecto I (OE1): “Desarrollo de una estrategia de diagnóstico genético-molecular de las ataxias hereditarias”

4.1.1. Población Total

Durante el período comprendido entre mayo del 2008 y diciembre de 2019, se evaluaron 1250 pacientes en el Consultorio y Laboratorio de Neurogenética del Hospital JM Ramos Mejía. De estos, 334 sujetos fueron incluidos en el Programa de Ataxias Crónicas y Progresivas por presentar una disfunción cerebelosa atáxica crónica de presunta etiología genética. El desarrollo e implementación del algoritmo diagnóstico propuesto (**Figuras 6, 7 y 8**) permitió sistematizar el estudio de la población y seleccionar el abordaje diagnóstico más adecuado. La **Tabla 11** presenta un resumen de las características demográficas de la población incluida.

4.1.1.1. Análisis Global

La población de 334 pacientes tiene una composición similar de ambos sexos con un ligero predominio del sexo femenino (F: 56,5% / M: 43,5%) y una edad media de 41 años que incluye un amplio rango etario (2–86). La media de la edad de inicio de la sintomatología fue de 31,2 años (<1-81). Casi la mitad de los sujetos incluidos (154 pacientes) referían una historia familiar del trastorno. El resto de las características demográficas son resumidas en la **Tabla 11**.

El rédito diagnóstico del enfoque propuesto y utilizado, definido como el porcentaje de pacientes diagnosticados exitosamente, alcanzó aproximadamente un tercio de los pacientes incluidos en el estudio (33,8%). Específicamente, se arribó al diagnóstico molecular en 113 sujetos. Esta tasa resultó significativamente mayor en el subgrupo de pacientes con historia familiar positiva, donde la tasa global de éxito diagnóstico se incrementó hasta un 55%. En aquellos con un patrón de herencia AD, se obtuvo un diagnóstico molecular en 41 de 81 familias (50,6%), mientras que en los casos en que la historia familiar era sugerente de un patrón de herencia AR, se arribó al diagnóstico en 20 de 29 familias (69%) (**Tabla 12**).

Otro elemento destacable del análisis global es el extenso período de tiempo de la denominada “odisea diagnóstica”. La demora estimada desde el inicio del primer síntoma hasta la evaluación en nuestro centro y la posterior confirmación molecular fue de aproximadamente 11 años (0-60).

***Tabla 11. Datos demográficos de la población general.AD**: Autosómico dominante; **AR**: Autosómico Recesiva; **AD**: Autosómico Dominante; **AR**: Autosómico Recesiva*

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	
Total de pacientes con Ataxia (n)	334
Sexo (%)	
Femenino	56.5 %
Masculino	43.5 %
Edad promedio en años (mín-máx)	41 años (2- 86 años)
Historia familiar (%)	46 %
Patrón de Herencia (%)	
AD	73 %
AR	27 %
Edad media de inicio de los síntomas en años (mín-máx).	31.2 años (<1 -81 años)
Tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la primera consulta en Neurogenética en años (mín-máx).	10.07 años (0-60 años)

***Tabla 12. Pedigrees con diagnóstico molecular confirmatorio N**: número; **AD**: Autosómico Dominante; **AR:** Autosómico Recesivo*

N total de pedigrees con Historia Familiar Diagnóstico molecular confirmatorio	110 familias 55% (61/110)
N total de pedigrees con Herencia AD Diagnóstico molecular confirmatorio	81 familias 50,6% (41/81)
N total de pedigrees con Herencia AR Diagnóstico molecular confirmatorio	29 familias 69% (20/29)
Pacientes con Ataxia Esporádica Diagnóstico molecular confirmatorio	180 pacientes 16% (29/180)

4.1.1.2. Ataxias hereditarias con diagnóstico molecular confirmatorio.

A continuación, se describen en detalle características de los 113 pacientes con diagnóstico molecular confirmatorio dividiendo la muestra en ataxias dominantes y recesivas.

4.1.1.3. Ataxias Autosómicas Dominantes

Un total de 55 pacientes fueron diagnosticados con una forma de ataxia AD. El subtipo más frecuentemente identificado fue SCA2 (36%), seguido de SCA3 (18%) y SCA1 (14%). (**Tabla 13**). Un detalle del resto de ataxias AD identificadas se presenta en la **Figura 12** y **Tabla 15.**

La distribución por género fue ligeramente predominante en mujeres (F:54,5% / M:45,5%), y la edad promedio de los afectados al momento de la consulta fue de 40,1 años (2-69). La edad media de inicio de los síntomas fue a los 30,7 años (<1-63), y el tiempo de demora hasta un diagnóstico molecular confirmatorio fue de 9,1 años (**Tabla 13**). El común denominador fue la presencia de una historia familiar positiva (múltiples afectados en la misma familia), excepto en un caso de SCA2 y en un caso de Ataxia y Epilepsia asociada a mutación en el gen *KCNA2* en los cuales se destacaba la ausencia de historia familiar.

El promedio de afectación cerebelosa según la escala de SARA fue muy variable (0-32 puntos). Una evolución rápidamente progresiva con severo compromiso cerebeloso caracterizó a los 4 sujetos diagnosticados con GSS, comparados con el resto de subtipos de ataxias AD identificadas.

En la exploración de los movimientos oculares, se destacaba la presencia de sacádicos horizontales marcadamente lentos en 16 de los 20 sujetos con SCA2 (80%), como también en el plano vertical (12/20). Las características de los hallazgos de la exploración ocular en el resto de los sujetos se resumen en la **Tabla 17.**

La presencia de parkinsonismo y polineuropatía, fueron los hallazgos extracerebelosos más frecuentes en sujetos con SCA3 (encontrados en 5 y 6 pacientes respectivamente). La presencia de parkinsonismo a su vez fue constatada en 6 sujetos con SCA2, un sujeto con SCA6, un sujeto con SCA1 y un sujeto con EH. Se encontraron mioclonías en dos pacientes con SCA2, en uno con SCA3 y en uno de los sujetos portadores de GSS. En los pacientes con SCA1 fue infrecuente la presencia de síntomas extracerebelosos, excepto el hallazgo de signos de afectación piramidal, presente en 4 de los 8 sujetos diagnosticados. La afectación cognitiva fue infrecuente, excepto en un sujeto con GSS y en otro con diagnóstico molecular de EH. Un sujeto con SCA3 presentó un fenotipo caracterizado por la presencia de paraparesia espástica asociada a parkinsonismo en ausencia de signos de disfunción cerebelosa (**Tabla 18**).

Se realizó una RMN de cerebro en 31 de los pacientes evaluados. La presencia de atrofia cerebelosa vermiana y hemisférica fue el común denominador en más del 76% de casos (27/31). La presencia de atrofia cerebelosa y del tronco encefálico se evidenció en seis sujetos, la mayoría de ellos pacientes con SCA2 (4/6). Asimismo, en dos pacientes con SCA2, se evidenció la presencia de cambios en la intensidad de la señal pontina en T2W, lo que sugiere el "signo de la cruz". En el paciente con un diagnóstico final de SCA48, además de la atrofia cerebelosa, se observó una hiperintensidad en T2W que afecta los núcleos dentados y se extiende a los pedúnculos cerebelosos medios.

Tabla 13. Resumen de las Ataxias Autosómicas Dominantes diagnosticadas

Característica	Dato
Total de pacientes con sospecha de AD	55
Subtipo más frecuente	SCA2 (36%)
Distribución por sexo	54,5% femenino, 45,5% masculino
Edad promedio al momento de la consulta	40,1 años (rango: 2-69)
Edad media de inicio de síntomas	30,7 años (rango: <1-63)
Tiempo promedio hasta diagnóstico	9,1 años
Presencia de historia familiar	96,4% (53/55)

4.1.1.4. Ataxias Autosómicas recesivas

Un total de 58 sujetos fueron diagnosticados con un cuadro de ataxia AR. Ampliamente, AF fue la entidad más frecuente, identificada en 62% de los casos (36/58) (**Tabla 14**). Un detalle del resto de ataxias AR diagnosticadas se presenta en la **Figura 12 y Tabla 16.**

La distribución por género fue predominante en varones (M: 58,4% / F: 41,6%), y la edad promedio de los afectados al momento de su evaluación fue de 27 años (4-75). La media de inicio de los síntomas fue a los 13,2 años (1-33) y el tiempo de demora hasta un diagnóstico final fue de aproximadamente 15 años. En casi la mitad de los casos (27/58), el sujeto afectado tenía un cuadro esporádico sin historia familiar evidente (**Tabla 14**).

La mayoría de los pacientes con AF tenían un fenotipo clásico de presentación (31/36), como formas atípicas se destacan a 4 individuos con un inicio mayor a los 20 años, y fenotipo compatible con una forma de inicio tardío (LOFA de su abreviatura en ingles *Late Onset Friedreich Ataxia*) y una

paciente que inicia con ataxia a la edad de 30 años en la cual se confirmó un fenotipo de AF de inicio muy tardío (VLOFA de las abreviaturas en ingles *Very Late Onset Friedreich Ataxia*) (**Tabla 19**). Se observó una escala SARA media de 20 (rango 6-39 puntos).

En la exploración de movimientos oculares de los pacientes con AF la presencia de macroondas cuadradas (15/36) y sacádicos hipométricos tanto horizontales (20/36) como verticales (20/36) fueron las alteraciones más comunes (**Tabla 20**). La presencia de miocardiopatía (8/36) y diabetes mellitus (1/36) fueron hallazgos poco frecuentes en nuestra serie y en 8 sujetos se encontró la presencia de pie cavo en contexto de un fenotipo clásico de presentación (**Tabla 19**).

En 35 pacientes con AF se identificaron ambos alelos expandidos en el intrón 1 del gen *FXN*; el paciente restante fue diagnosticado con AF por heterocigosis compuesta al identificarse la presencia de un solo alelo expandido y una variante puntual en el exón 3 del gen *FXN* (**Figura 13**). La descripción del resto de sujetos con otras formas de AR se muestra en la **Tabla 16**.

La atrofia cerebelosa en la RMN se evidenció en el 56% de nuestra cohorte. Las etiologías asociadas con una RMN normal en la primera evaluación fueron el síndrome de mioclonía-renal, ataxia secundaria a mutaciones bialélicas en OPA1 y xantomatosis cerebrotendinosa. Se encontró atrofia cerebelosa en el 30% de los pacientes con AF, especialmente en aquellos con enfermedad avanzada. Las etiologías más comunes en las que se presentó una atrofia cerebelosa severa fueron AT, la ataxia con apraxia oculomotora tipo 1 y tipo 2, la ataxia cerebelar autosómica recesiva tipo 1 (ARCA1) y la ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva tipo 7. En un paciente con síndrome de Joubert, se encontró el clásico "signo de diente molar".

Tabla 14: Resumen de las Ataxias autosómicas recesivas diagnosticadas

Característica	Dato
Total de pacientes con sospecha de AR	58
Subtipo más frecuente	Ataxia de Friedreich (62%)
Distribución por sexo	58,4% masculino, 41,6% femenino
Edad promedio al momento de la evaluación	27 años (rango: 4-75)
Edad media de inicio de síntomas	13,2 años (rango: 1-33)
Tiempo promedio hasta diagnóstico	15 años
Casos esporádicos	46,6% (27/58)

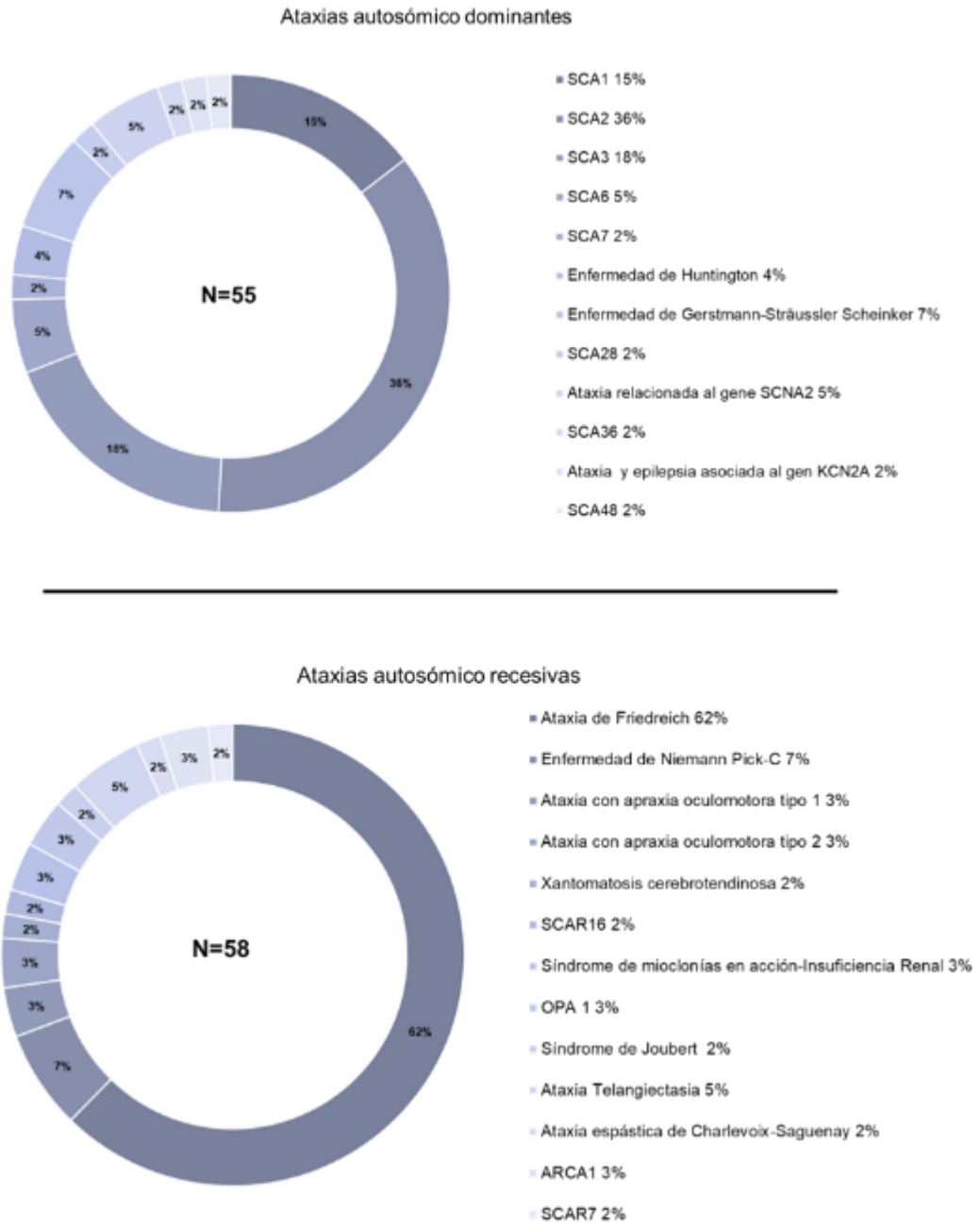


Figura 12. Frecuencia de casos con diagnóstico molecular confirmatorio de ataxia hereditaria.

***Tabla 15. Pacientes diagnosticados con ataxias con patrón de herencia Autosómica Dominante**. **P:** Paciente; **SCA**: Ataxia espinocerebelosa; **F**: Femenino; **M:** Masculino; **NGS**: Técnicas de secuenciación de nueva generación, **m:** meses*.

P	Sexo	Edad (años)	Edad Inicio (años)	Evolución (años)	Historia familiar	Diagnóstico molecular	Gen	Mutación	Literatura	Metodología
1	F	39	38	1	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (32/54 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
2	F	30	28	2	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (31/48 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
3	F	29	29	0	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (32/53 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
4	F	45	38	7	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (30/50 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
5	M	39	30	9	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (30/48 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
6	F	55	49	6	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (29/ 43 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
7	M	40	36	16	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (30/52 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
8	F	61	45	16	Si	SCA1	*ATXN1*	Expansión anormal de la repetición CAG (29/42 repeticiones)	(Orr, Chung et al. 1993)(52)	PCR y electroforesis capilar
9	M	59	45	14	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (20/38 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
10	M	30	23	7	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/43 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
11	M	35	22	13	No	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/43 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
12	M	35	23	12	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/43 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
13	F	14	13	1	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/51 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar

Continuación Tabla 15

14	F	47	40	7	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/39 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
15	F	56	40	16	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/44 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
16	F	25	23	2	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/40 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
17	F	31	25	6	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/44 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
18	F	26	11	15	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/51 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
19	M	30	19	11	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/40 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
20	M	23	10	13	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/52 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
21	M	69	60	9	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/37 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
22	M	51	47	4	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/38 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
23	M	57	50	7	No	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/40 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
24	M	21	18	3	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/44 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
25	M	46	18	26	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/39 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
26	F	48	15	3	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/39 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
27	F	25	20	5	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/44 repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar
28	M	44	30	14	Si	SCA2	*ATXN2*	Expansión anormal de la repetición CAG (22/44repeticiones)	(Lorenzetti, Bohlega et al. 1997)(53)	PCR y electroforesis capilar

Continuación Tabla 15

29	M	45	35	10	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (23/64 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
30	M	55	51	4	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (19/63 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
31	F	34	32	2	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (23/71 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
32	F	32	30	2	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (23/71 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
33	F	48	36	12	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (31/62 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
34	M	51	44	7	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (10/62 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
35	M	65	39	26	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (19/62 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
36	M	56	50	6	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (10/63 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
37	M	33	31	2	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (10/67 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
38	F	53	49	4	Si	SCA3	*ATXN3*	Expansión anormal de la repetición CAG (20/66 repeticiones)	(Kawaguchi, Okamoto et al. 1994)(54)	PCR y electroforesis capilar
39	F	66	63	3	Si	SCA6	*CACNA1A*	Expansión anormal de la repetición CAG (9/20 repeticiones)	(Riess, Schols et al. 1997)(55)	PCR y electroforesis capilar
40	F	38	34	4	Si	SCA6	*CACNA1A*	Expansión anormal de la repetición CAG (10/21 repeticiones)	(Riess, Schols et al. 1997)	PCR y electroforesis capilar
41	F	74	55	15	Si	SCA6	*CACNA1A*	Expansión anormal de la repetición CAG (4/21 repeticiones)	(Riess, Schols et al. 1997)	PCR y electroforesis capilar
42	F	37	27	10	Si	SCA7	*ATXN7*	Expansión anormal de la repetición CAG (7/66 repeticiones)	(David, Abbas et al. 1997)(56)	PCR y electroforesis capilar
43	M	49	37	19	Si	Enfermedad de Huntington	*HTT*	Expansión anormal de la repetición CAG (20/39 repeticiones)	(The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993)(57)	PCR y electroforesis capilar
44	F	23	20	3	Si	Enfermedad de Huntington	*HTT*	Expansión anormal de la repetición CAG (10/62 repeticiones)	(The Huntington's Disease	PCR y electroforesis capilar

									Collaborative Research Group. 1993)(57)	
45	F	40	32	8	Si	Enfermedad de Gerstmann-Sträussler Scheinker	*PRNP*	NM_000311·3:c.305C>T:(p.Pro102Leu)	(Mallucci, Campbell et al. 1999)(58)	PCR y secuenciación de Sanger
46	F	52	47	6	Si	Enfermedad de Gerstmann-Sträussler Scheinker	*PRNP*	NM_000311·3:c.305C>T:(p.Pro102Leu)	(Mallucci, Campbell et al. 1999)(58)	PCR y secuenciación de Sanger
47	F	28	24	4	Si	Enfermedad de Gerstmann-Sträussler Scheinker	*PRNP*	NM_000311·3:c.305C>T:(p.Pro102Leu)	(Mallucci, Campbell et al. 1999)(58)	PCR y secuenciación de Sanger
48	M	41	37	4	Si	Enfermedad de Gerstmann-Sträussler Scheinker	*PRNP*	NM_000311.3:c.350C>T:(p.Ala117Val)	(Mallucci, Campbell et al. 1999)(58)	PCR y secuenciación de Sanger
49	F	51	41	10	Si	SCA28	*AFG3L2*	NM_006796:c.2114T>C:(p.Ille705Thr)	No reportada previamente	NGS
50	M	5	1m	5	Si	Ataxia relacionada al gene *SCNA2*	*SCN2A*	NM_021007.2: *c.*788C>T:(p.Ala263Val)	(Liao, Anttonen et al. 2010)(59)	NGS
51	F	2	<1	2	Si	Ataxia relacionada al gene *SCNA2*	*SCN2A*	NM_021007.2: c.788C>T:(p.Ala263Val)	(Liao, Anttonen et al. 2010)	NGS
52	M	38	<1	38	Si	Ataxia relacionada al gen *SCNA2*	*SCN2A*	NM_021007.2:c.788C>T:(p.Ala263Val)	(Liao, Anttonen et al. 2010)(59)	NGS
53	F	66	19	45	Si	SCA36	*NOP56*	Expansión anormal de la repetición GGCCTG	(Kobayashi, Abe et al. 2011)(60)	TP-PCR y electroforesis capilar
54	F	2	8m	1	No	Ataxia y epilepsia asociada al gen *KCN2A*	*KCN2A*	NM_001204269:c.890G>A:(p.Arg297Gln)	(Syrbe, Hedrich et al. 2015)(61)	NGS
55	M	45	44	4	Si	SCA48	*STUB1*	NM_005861.3:c.854C>A:(p.Ala285Asp)	No reportada previamente	NGS

***Tabla 16. Pacientes diagnosticados con ataxias con patrón de herencia Autosómica Recesiva**. **P:** Paciente; **F**: Femenino; **M:** Masculino; **NGS**: Técnicas de secuenciación de nueva generación, **m:** meses; **Hom**: homocigota*

P	Sexo	Edad (años)	Edad de inicio (años)	Evolución (años)	Historia Familiar	Diagnóstico familiar	Gen	Mutación	Literatura	Metodología
1	M	26	12	14	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
2	M	23	12	11	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
3	M	22	16	6	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
4	F	14	8	6	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
5	M	22	5	17	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
6	F	36	17	19	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
7	F	75	20	55	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
8	M	18	14	4	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
9	F	37	13	24	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
10	M	32	23	9	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
11	M	48	17	31	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar

Continuación Tabla 16

12	F	26	5	11	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
13	M	20	12	8	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
14	M	49	16	33	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
15	M	45	17	28	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
16	M	30	5	25	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
17	F	47	16	31	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
18	M	48	18	30	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA NM_000144.4: c.354C>G:(p.Tyr118Ter)	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62) , (Gellera, Castellotti et al. 2007) (63))	TP-PCR y electroforesis capilar PCR y secuenciación de Sanger
19	F	21	11	10	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
20	M	64	11	53	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
21	M	16	14	2	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
22	F	20	14	6	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
23	M	19	9	10	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar

Continuación Tabla 16

24	F	14	13	1	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
25	M	45	17	28	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
26	F	39	30	9	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
27	M	16	2	13	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
28	F	11	5	6	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
29	F	45	12	33	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
30	F	23	15	8	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
31	M	25	22	3	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
32	F	21	17	4	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
33	M	12	9	3	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
34	M	32	24	8	No	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
35	F	18	17	1	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
36	M	20	16	3	Si	Ataxia de Friedreich	*FXN*	Repetición anormal de la repetición GAA	(Campuzano, Montermini et al. 1996)(62)	TP-PCR y electroforesis capilar
37	F	29	21	8	No	Enfermedad de Niemann Pick-C	*NPC1*	NM_000271.4: c.2872C>T:(p.Arg958Ter)	(Sun, Marks et al. 2001)(64)	NGS

38	F	36	33	3	Si	Enfermedad de Niemann Pick-C	*NPC1*	NM_000271.5: c.1552C>T:(p.Arg518Trp) NM_000271.5: c.3019C>G:(p.Pro1007Ala)	(Greer, Dobson et al. 1999)(65), (Ribeiro, Marcao et al. 2001)(66)	NGS
39	M	41	10	31	Si	Enfermedad de Niemann Pick-C	*NPC1*	NM_000271.5: c.1552C>:(p.Arg518Trp) NM_000271.5: c.3019C>G:(p.Pro1007Ala)	(Greer, Dobson et al. 1999)(65)(Ribeiro, Marcao et al. 2001)(66)	PCR y secuenciación de Sanger
40	M	41	30	10	Si	Enfermedad de Niemann Pick-C	*NPC1*	NM_000271.5:c.1552C>T:(p.Arg518Trp) NM_000271.5:c.3019C>G:(p.Pro1007Ala)	(Greer, Dobson et al. 1999) (65) (Ribeiro, Marcao et al. 2001)(66)	PCR y secuenciación de Sanger
41	M	11	1	11	Si	Ataxia con apraxia oculomotora tipo 1	*APTX*	NM_175069.1:c.879G>A:(p.Trp293Ter) (Hom)	(Moreira, Barbot et al. 2001)(67)	NGS
42	F	12	4	4	Si	Ataxia con apraxia oculomotora tipo 1	*APTX*	NM_175069.1:c.879G>A:(p.Trp293Ter) (Hom)	(Moreira, Barbot et al. 2001)(67)	PCR y secuenciación de Sanger
43	M	19	11	8	No	Ataxia con apraxia oculomotora tipo 2	*SETX*	NM_001351527:c.7154T>G:(p.Val2385Gly) NM_001351527.1:c.15_17delTTG:(p.Cys5del)	No reportada previamente	NGS
44	F	26	15	11	No	Ataxia con apraxia oculomotora tipo 2	*SETX*	NM_001351527:c.1856_1863del(p.Asn620Rfs*4) NM_001351527.1:c.15_17delTTG:(p.Cys5del)	No reportada previamente	NGS
45	M	21	5	16	No	Xantomatosis cerebrotendinosa	*CYP27A1*	NM_000784.3:c.1213C>T:(p.Arg 405Trp) (Hom)	(Verrips, Hoefsloot et al. 2000)(68)	PCR y secuenciación de Sanger
46	M	24	17	7	No	Ataxia espinocerebelosa autosómico recesiva tipo 16 (SCAR16)	*STUB1*	NM_005861·2:c.612+1G>C NM_005861·2:c.823C>G:(p.Leu275Val)	No reportada previamente	NGS
47	M	29	19	10	Si	Síndrome de mioclonías en acción-Insuficiencia Renal	*SCARB2*	NM_005506:c.704+1G>A (Hom)	(Dibbens, Michelucci et al. 2009)(69)	PCR y secuenciación de Sanger

Continuación Tabla 16

48	M	26	24	2	Si	Síndrome de mioclonías en acción-Insuficiencia Renal	*SCARB2*	NM_005506:c.704+1G>A (Hom)	(Dibbens, Michelucci et al. 2009)(69)	PCR y secuenciación de Sanger
49	F	32	2	30	Si	Ataxia recesiva secundaria a mutaciones bialélicas en OPA 1(OPA1)	*OPA1*	NM_015560: c.267G>T:(p.Trp89Cys) NM_015560: c.635_636delAA:(p.Lys212ArgfsTer4)	No reportada previamente (Toomes, Marchbank et al. 2001)(70)	NGS
50	F	31	2	29	Si	Ataxia recesiva secundaria a mutaciones bialélicas en OPA 1(OPA1)	*OPA1*	NM_015560: c.267G>T:(p.Trp89Cys) NM_015560: c.635_636delAA:(p.Lys212ArgfsTer4)	No reportada previamente (Toomes, Marchbank et al. 2001)(70)	PCR y secuenciación de Sanger
51	M	4	<1 Year	4	Si	Síndrome de Joubert	*CC2D2A*	NM_001080522: c.4667A>T:(p.Asp1556Val) NM_001080522:c.3289delG:(p.Val1097PhefsTer2)	(Mougou-Zerelli, Thomas et al. 2009) (71)(Bachmann-Gagescu, Dempsey et al. 2015)(72)	NGS
52	M	7	7 m	7	No	Ataxia telangiectasia	*ATM*	NM_000051.3:c.6374 A>G:(p.His2125Arg) NM_000051.3:c.2922-1G>A.	RCV 000159746.1 https://databases.lovd.nl/shared/genes/ATM (registry #ATM_00463)	NGS
53	M	6	18 m	4	No	Ataxia telangiectasia	*ATM*	NM_000051.3:c.614T>G:(Leu205Ter) NM_000051.3:c.8827_8828delAC:(p.Thr2473GlyfsTer3)	No reportada previamente	NGS
54	F	22	5	17	No	Ataxia telangiectasia	*ATM*	NM_000051.3:c.1373G>A:(p.Cys458Tyr) NM_000051:c.8785_8788delAGGT:(p.Arg2929MetfsTfs*2)	No reportada previamente	NGS
55	M	24	2	22	No	Ataxia espástica de Charlevoix-Saguenay	*SACS*	NM_001278055:c.4492C>T (p.Arg1498Ter) NM_001278055: c.2388dupA (p.Leu797IlefsTer5)	No reportada previamente	NGS
56	M	40	19	21	Si	Ataxia cerebelar autosómico recesiva tipo 1(ARCA1)	*SYNE 1*	NM_033071.3: c.20314delC:(p.Leu6772TrpfsTer13) NM_O33071.3: c.1980G>A:p.(Trp660Ter)	No reportada previamente	NGS

57	M	37	22	15	Si	Ataxia cerebelar autosómico recesiva tipo 1(ARCA1)	*SYNE 1*	NM_033071.3: c.20314del: (p.Leu6772Trpfs*13) NM_O33071.3: c.1980G>A: p.(Trp660Ter)	No reportada previamente	PCR y secuenciación de Sanger
58	M	17	7	10	No	CLN2/Ataxia espinocerebelar autosómico recesiva tipo 7 (SCAR 7)	*TPP1*	NM_000391: exon7:c.827A>T:(p.Asp276Val) NM_000391.3:c.887-10A>G	(Kohan, Cismondi et al. 2009)(73) , (Bessa, Teixeira et al. 2008)(74)	NGS

Tabla 17. Alteración de movimientos oculares en sujetos con ataxias autosómico dominantes. SCA: *Ataxia espinocerebelosa****; H:*** *Horizonta****l; V:*** *Vertica****l; N****: Número de pacientes afectados.*

	SCA1 (N:8)		**SCA2 (N: 20)**		**SCA3 (N:10)**		**SCA6 (N:3)**		**SCA7 (N:1)**		**SCA36 (N:1)**		**SCA28 (N 1)**		**GSS (N:4)**		**EH (N:2)**	
	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V
Seguimiento fraccionado	3	2	7	5	2	1	-	-	1	1	-	-	1	1	2	2	1	-
Sacádicos																		
• **Latencia Prolongada**	-	-	9	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
• **Velocidad Disminuida**	2	1	16	12	3	1	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2	2	2
• **Dismetría**																		
- **Hipometría**	1	1	5	7	3	2	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2	2	1
- **Hipermetría**	1		2	2	2	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
Nistagmus	-	-	4	2	6	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	-

Tabla 18. Manifestaciones extracerebelosas en pacientes con SCAs SCA*: Ataxia espinocerebelosa;* ***EH****: Enfermedad de Huntington;* ***GSS****: Enfermedad de Gerstmann-Straussler Scheinker.* ***N****: Número de pacientes afectados.*

Tipo De Ataxia	SCA1 (N:8)	SCA2 (N:20)	SCA3 (N:10)	SCA6 (N:3)	SCA7 (N:1)	EH (N:2)	GSS (N:4)	SCA36 (N:1)	SCA28 (N:1)
Compromiso visual	-	-	-	--	1	-	-	-	-
Compromiso Piramidal	4	4	3	11	-	-	2	-	1
Polineuropatía	-	3	6	--	-	-	1	-	-
Distonía	-	-	2	--	-	-	-	-	-
Parkinsonismo	1	6	5	11	-	1	-	-	-
Mioclonías	-	2	1	--	-	-	1	-	-
Corea	-	-	-	--	-	-	-	-	-
Compromiso cognitivo	-	-	-	--	-	1	1	-	-

Tabla 19. ***Ataxia De Friedreich***

Datos clínicos generales			
Número total de pacientes	36		
Edad (mediana y rango)	31,5 (11-75)	**Fenotipo clásico**	31/36 (86%)
Edad de inicio de síntomas (mediana y rango)	14 (2-30)	**Puntaje en escala SARA (media y rango)**	20 (6-39)
Historia familiar	29/36 (80%)	**Alteración de movimientos oculares**	23/30 (76%)
Sintomas extracerebelosos		**Manifestaciones sistémicas**	
Polineuropatía	27/36 (75%)	**Pie cavo**	8/36 (22%)
Arreflexia	31/36 (84%)	**Diabetes**	1/36 (3%)
Hiperreflexia	4/36 (11%)	**Hipoacusia**	5/36 (14%)
Babinski	24/36 (66%)	**Miocardiopatía**	8/36 (22%)
Clonus	5/36 (14%)	**Escoliosis**	20/36 (55%)
Paraparesia espástica	2/36 (5%)		
Hoffman	1/36 (3%)		

Tabla 20. Alteración de movimientos oculares en sujetos con ataxias autosómico recesivas AF: Ataxia de Friedreich, AOA: Ataxia con apraxia oculomotora, SJ: *Síndrome de Joubert****, SMA-IR:*** *mioclonías en acción -Insuficiencia Renal* ***SCAR16:*** *Ataxia espinocerebelosa autosómico recesiva tipo 16: NPC****:*** *Enfermedad de Niemann Pick tipo C****; OPA: Atrofia Óptica; AT:*** *Ataxia telangiectasia****, ARSACS:*** *Ataxia espástica de Charlevoix – Saguenay****; H****: Horizontal;* ***V:*** *Vertical****; N:*** *Número de pacientes afectados.*

	AF (N:36)		AOA1 (N:2)		AOA2 (N:2)		SJ (N:1)		SMAIR (N:2)		SCAR16 (N:1)		OPA1 (N:1)		CTX (N:1)		ARSACS (N:1)	
	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V
Seguimiento fraccionado	22	17	2	2	2	2	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	1	-
Sacádicos																		
• **Latencia Prolongada**	4	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-
• **Velocidad Disminuida**	6	2	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-
• **Dismetría**																		
- **Hipométricos**	20	20	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-
- **Hipermétricos**	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nistagmus	10	2	0	0	2	1	-	-	-	-	1	-	2	-	.	-	-	-
Apraxia de la mirada	-		-		1		-		-		-		-		-		-	
Ondas cuadradas	15		-		-		-		-		-		-		-		-	

4.1.2. Empleo de técnicas de secuenciación masiva en paralelo para el diagnóstico de ataxias:

Se emplearon técnicas de secuenciación de segunda generación en 26 pacientes sin diagnóstico confirmatorio tras el abordaje inicial. Esta aproximación permitió identificar la causa etiológica en 17 casos (65,4%) (**Tabla 21**). Los métodos utilizados incluyeron:

- Secuenciación dirigida (TS): 14 pacientes, 10 diagnósticos confirmados
- Secuenciación del exoma completo (WES): 11 pacientes, 6 diagnósticos confirmados
- Secuenciación del genoma completo (WGS): 1 paciente, 1 diagnóstico confirmado

En 14 sujetos fue posible realizar TS (panel multigénico), de los cuales en 10 de ellos se logró obtener un diagnóstico molecular confirmatorio. De los 10 individuos, un paciente de 51 años que consultaba por una ataxia familiar compatible con un patrón de herencia AD fue diagnosticado con

SCA28 después de la identificación de una variante patogénica en el gen *AFG3L2*.Se realizó un diagnóstico de AOA tipo 2 en dos pacientes, uno de sexo masculino afectado con una ataxia espástica progresiva esporádica y el otro, una paciente de sexo femenino con apraxia oculomotora, atrofia cerebelosa y niveles elevados de alfafetoproteína en suero. Además, cuatro casos de ataxia de inicio temprano se resolvieron después de encontrar variantes patogénicas en los genes CC2D2A y *ATM* (tres casos), respectivamente. Además, se diagnosticó a un paciente con un fenotipo cerebelar de lipofuscinosis neuronal ceroidea tardía o SCAR7 debido a variantes patogénicas en el gen *TPP1*; a un hombre de 37 años con un síndrome cerebelar puro se le diagnosticó enfermedad ARCA1 debido a la presencia de dos variantes patogénicas en el gen *SYNE1*, y dos pacientes de sexo femenino con ataxia y parálisis supranuclear de la mirada recibieron un diagnóstico de NPC1.

En 11 pacientes se realizó WES, de los cuales se arribó a un diagnóstico confirmatorio en 6 sujetos: Una paciente de 8 años con un cuadro de ataxia de inicio en la infancia asociado a la presencia de corea y atrofia cerebelosa en la cual se confirmó el diagnóstico de AOA1; otra paciente que inicia a los 8 meses de vida con un síndrome caracterizado por la presencia de ataxia y epilepsia en la cual se encontró una variante en el gen *KCNA2* en heterocigosis*; dos pacientes con variantes patogénicas en el gen STUB1*, uno con un cuadro compatible con una ataxia AR, SCAR16 y otro con SCA48,un forma de ataxia AD; una familia con un cuadro de ataxia y compromiso visual desde la infancia y variante en el gen *OPA1* la cual se describe en la sección siguiente, y un paciente de 24 años con un cuadro de ataxia espástica, hiperreflexia, pie cavo y polineuropatía sugestiva de un fenotipo AF-*Like* en el cual se arribó al diagnóstico de Ataxia espástica de Charlevoix – Saguenay mediante la identificación de dos variantes en heterocigosis compuesta en el gen *SACS.*

Se logró realizar WGS en un paciente con un cuadro clínico caracterizado por ataxia episódica, epilepsia neonatal/infantil y retraso madurativo identificándose la presencia de una variante en el gen *SCN2A* y cuyo caso también se describe en la sección siguiente.

El diagnóstico mencionado previamente de SCA28 llevó a estudiar a 30 pacientes con un cuadro de AH caracterizado por un patrón de herencia AD y una presentación clínica compatible con SCA28. En estos pacientes, se excluyeron las causas más comunes de AH de tipo AD, como SCA1, SCA2, SCA3 y SCA6.

Para el análisis, se utilizaron técnicas de PCR y secuenciación de Sanger enfocadas en las regiones *hotspot* (exones 15 y 16) del gen *AFG3L2*, acorde a lo reportado en la bibliografía científica (75). Sin embargo, ninguno de los 30 pacientes presentó variantes patogénicas, probablemente patogénicas o de significado incierto en estos exones, descartando así el diagnóstico de SCA28 en estos individuos.

Tabla 21. Uso de técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS) en el estudio de pacientes con ataxia

Total de pacientes que fueron analizados mediante técnicas de NGS:	26
Número total de diagnósticos moleculares confirmatorios:	17/26 (65%)
Pacientes diagnosticados mediante pruebas de panel multigénico:	10/14
Pacientes diagnosticados mediante WES (Secuenciación del exoma completo):	6/11
Pacientes diagnosticados mediante WGS (Secuenciación del genoma completo):	1/1

4.1.3. Casos ilustrativos

A continuación, se presentan seis casos ilustrativos que muestran la complejidad y diversidad de las AH, así como la importancia de un enfoque diagnóstico integral y personalizado:

1. "Ataxia de Friedreich en Heterocigosis compuesta": Resalta la importancia de la persistencia en la sospecha clínica.
2. "Ataxia espinocerebelosa sin ataxia": Destaca la variabilidad fenotípica en SCA3.
3. "Medicina personalizada": Ejemplifican cómo el diagnóstico genético puede guiar intervenciones terapéuticas específicas.
4. "Descubriendo grandes simuladores": Demuestra el papel crucial de la secuenciación exómica en casos atípicos.
5. "Utilidad del estudio traslacional": Ilustra la importancia de combinar datos clínicos, genéticos y funcionales en el diagnóstico.

4.1.3.1. Caso 1: "Ataxia de Friedreich en Heterocigosis compuesta, persistencia en la sospecha clínica"

Varón de 48 años, sin historia familiar**,** con un cuadro progresivo de disfunción cerebelosa desde los 18 años. Al examen neurológico presentaba un cuadro de ataxia axial y apendicular (escala de SARA de 31 puntos) asociado a arreflexia, Babinski bilateral y apalestesia. El estudio de RMN de cerebro era normal.

Ante la sospecha de un fenotipo clásico de AF, se procedió a analizar por PCR y TP-PCR seguida de electroforesis capilar el intrón 1 del gen *FXN*, encontrándose una expansión anormal de

la secuencia repetitiva GAA en sólo uno de ambos alelos, sin poder arribar a un diagnóstico molecular (**Figura 13**).

En base a la alta sospecha clínica para un fenotipo clásico para AF, se procedió con la realización de PCR seguida de secuenciación por Sanger de los 5 exones del gen *FXN*, en busca de variantes puntuales, estudio mediante el cual se logró identificar en el exón 3 de *FXN*, una variante patogénica sin sentido en heterocigosis NM_000144.4 c.354C>G (*p.Tyr118X*) previamente reportada en la literatura, lo que permitió confirmar el diagnóstico molecular de AF por heterocigosis compuesta y corroborar la sospecha clínica inicial (**Figura 13**).

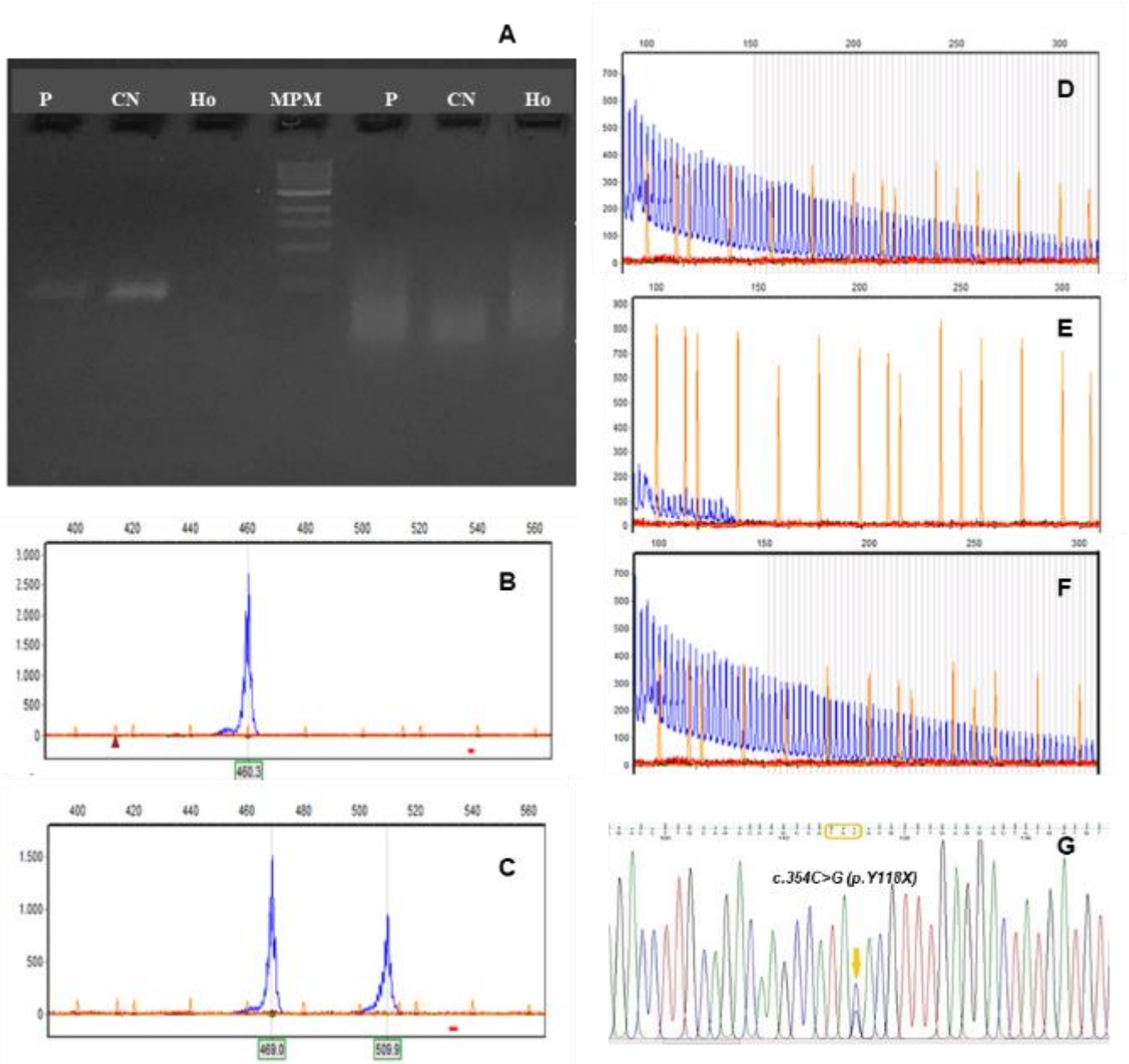


Figura 13. Estudio molecular realizado en Paciente con ataxia de Friedreich en Heterocigosis Compuesta A. *Electroforesis en gel de Agarosa**.** Corrida electroforética en un gel de Agarosa 1,5% teñido con Bromuro de Etidio de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del intrón1 del gen FXN mediante* $PCR_{Fluorescente}$ *(Calles 1, 2 y 3), y TP-PCR. (Calles 5,6 y 7). P: Paciente, CN: control negativo para la expansión, Ho: control homocigota para la expansión**.** MPM: Marcador de peso molecular (1 Kb Ladder)* ***B-F*** *Electroferogramas representativos de la* $PCR_{Fluorescente}$ *y la TP-PCR**.** El resultado de la* $PCR_{Fluorescente}$ *permite estimar el número de repeticiones en cada alelo. El eje vertical de los electroferogramas (B-C) representa la intensidad de señal y el eje horizontal el tamaño de fragmento en pares de bases. En* ***B*** *se observa la presencia de un único alelo con una cantidad normal de repeticiones GAA y corresponde al paciente en cuestión.* ***C.*** *control negativo para la expansión, se observa la presencia de dos alelos no expandidos. TP-PCR: Los picos de tamaño estándar son los coloreados en naranja y la señal TP-PCR se observa como una escalera de picos azules, que tienen una periodicidad de 3 pb, correspondiente a la repetición GAA. Si el perfil de picos se*

*extiende más allá del umbral es consistente con la presencia de al menos un alelo expandido. En **D** se observa el perfil en escalera consistente con la presencia de expansión y que corresponde al Paciente bajo estudio. **E.** Control Negativo para la expansión. **F.**Control Homocigota para la expansión **G.** Análisis de la Secuenciación de Sanger. En el electroferograma del paciente en estudio se identificó una variante en heterocigosis en el exón 3 del gen FXN, que se corresponde con una transversión en la tercera base del codón 118 que lleva al cambio de Tirosina por un codón stop prematuro.*

4.1.3.2. *Caso N°2: "Ataxia espinocerebelosa sin ataxia"*

Varón de 41 años con cuadro clínico de inicio a los 33 años caracterizado por compromiso motor progresivo en ambos miembros inferiores e historia familiar de trastornos de la marcha en otros familiares de rama materna. El examen neurológico demostraba la presencia de paraparesia espástica asociada a signos francos de liberación piramidal, y un síndrome parkinsoniano asimétrico respondedor a L-Dopa, en ausencia de ataxia (SARA: 0 puntos). Los exámenes complementarios eran normales al igual que la RMN de médula espinal, interpretándose como un cuadro de paraparesia espástica hereditaria AD asociada a parkinsonismo.

La evaluación del hermano, el cual también refería trastornos de la marcha, demostró la presencia de ataxia axial y apendicular como sintomatología predominante y asociada a polineuropatía y parkinsonismo. Esto permitió reconsiderar el fenotipo de la familia dentro del espectro de AH y mediante el empleo del algoritmo diagnóstico se confirmó el diagnóstico de SCA3 al encontrarse uno de los alelos del gen de la *ATXN3* anormalmente expandido, tanto en el paciente como en el hermano afectado (64 y 63 repeticiones respectivamente) (**Figura 14**)

Durante los años de evolución de su patología, el probando presentó una progresión de la paraparesia espástica y agregó signos de motoneurona inferior con compromiso bulbar, fasciculaciones a nivel de lengua y 4 miembros, además de marcada hipotrofia muscular y debilidad proximal en miembros superiores; se constató a su vez en controles posteriores de RMN de cerebro la presencia de leve atrofia cerebelosa (**Figura 14**), sin presentar a la fecha del análisis y desde el inicio de su sintomatología, signos semiológicos de ataxia.

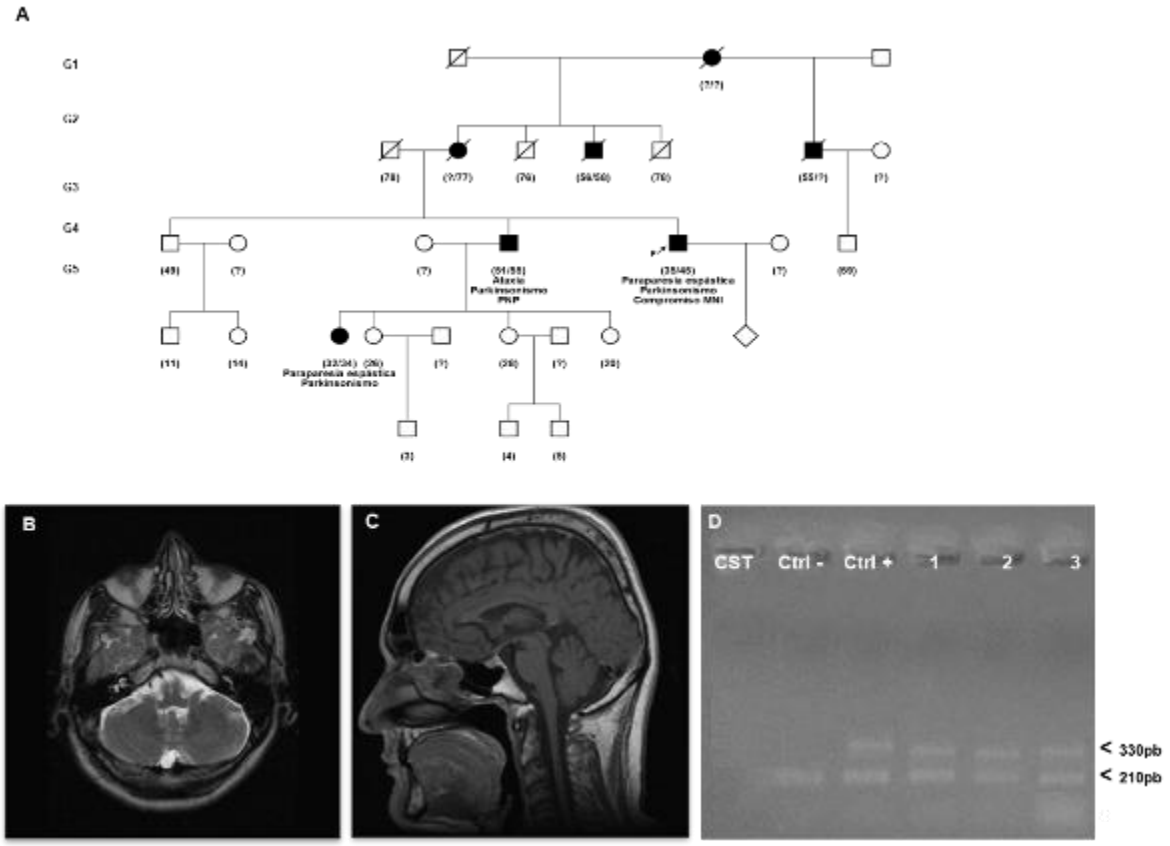


Figura 14. ***Familia afectada con SCA3. A. Familigrama.*** *Los números entre paréntesis representan en sujetos afectados: edad de inicio de síntomas/edad actual o edad de fallecimiento y en sujetos sanos: edad actual o edad de fallecimiento, según corresponda. G: Generación. P: Caso índice.* ***B y C.*** *Resonancia Magnética de Cerebro donde se evidencia en un corte axial en T2 (imagen B) y sagital en T1 (imagen C) ligera atrofia cerebelosa.* ***D.*** *Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. CST: Control sin templado. Ctrl -: Control Negativo para la expansión, Ctrl +: control positivo para la expansión causante de SCA3. 1: Caso índice. 2: Familiar Afectado con Ataxia, Parkinsonismo y Polineuropatía 3: Familiar afectada con Parkinsonismo y polineuropatía. En el resultado de la electroforesis se marcan los alelos no patológicos y los alelos expandidos. En los casos 1,2 y 3 se observa un patrón de bandas semejante con el control positivo, lo que indica la presencia de una expansión en uno de los alelos del gen ATXN3.Los productos de amplificación fueron luego analizados por electroforesis capilar para confirmar el diagnóstico (no mostrado).*

4.1.3.3. Caso N°3 y N°4: "Medicina personalizada: Diagnósticos genéticos que permiten intervenciones terapéuticas"

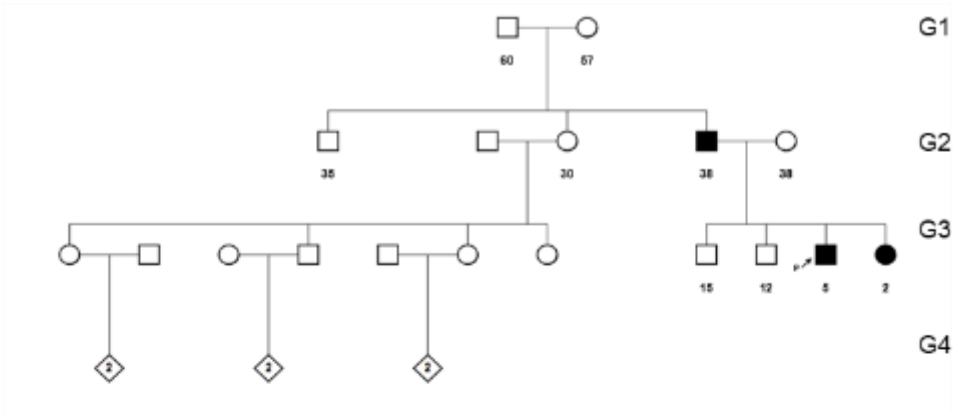
Caso N°3:

Paciente de 6 años, portador de epilepsia neonatal e infantil asociada a retraso madurativo, que inicia a los 4 años con episodios de ataxia paroxística. Su padre y hermana de 3 años referían antecedente de epilepsia neonatal, ataxia episódica y episodios paroxísticos de cefalea. La RMN de cerebro evidenciaba la presencia de atrofia cerebelosa marcada.

El cuadro clínico del paciente no era orientador para la búsqueda de una etiología definida y los estudios complementarios realizados tampoco resultaron útiles para el abordaje diagnóstico del paciente por lo cual se procedió a la realización de la secuenciación completa del genoma. Tras el análisis bioinformático se identificó una variante en heterocigosis en el gen *SCN2A* NM_021007.2 *c.788C>T (p.Ala263Val),* reportada previamente como patogénica, la cual se validó posteriormente mediante técnica de Sanger y se completó con un posterior análisis de segregación familiar mediante el mismo método (**Figura 15**).

La variante encontrada generaba una ganancia de función en el gen *SCN2A*, causante de un defecto en la hiperexcitabilidad de las neuronas donde se expresa, la cual puede ser modificada por fármacos bloqueantes de canales de Na^+ y condicionar un mejor control de los síntomas de los afectados. Tanto el probando como la hermana, posterior al diagnóstico, iniciaron tratamiento con fenitoína con una excelente respuesta terapéutica de las crisis convulsivas que presentaban.

A



B

Gene (transcript)	Nucleotide (protein)	Zygosity	Described by	In silico parameters*	MAF**	Variant classification***	Disorder (OMIM#, inheritance)
SCN2A (NM_001040142.1)	c.788C>T p.(Ala263Val)	Heterozygous	Liao, 2010, PMID: 20956790	3/4 damaging, conserved	Not reported	Pathogenic (class 1)	Early infantile epileptic encephalopathy type 11 (613721, AD)

*: number of in silico prediction programs that predict pathogenicity/all applicable programs (SIFT, PolyPhen2, AlignGVD, MutationTaster). **highest minor allele frequency (MAF) of representative population (Exome Aggregation Consortium database (ExAC), Exome Sequencing Project (ESP), or 1000Genome project (1000G). *** based on ACMG recommendations.

C

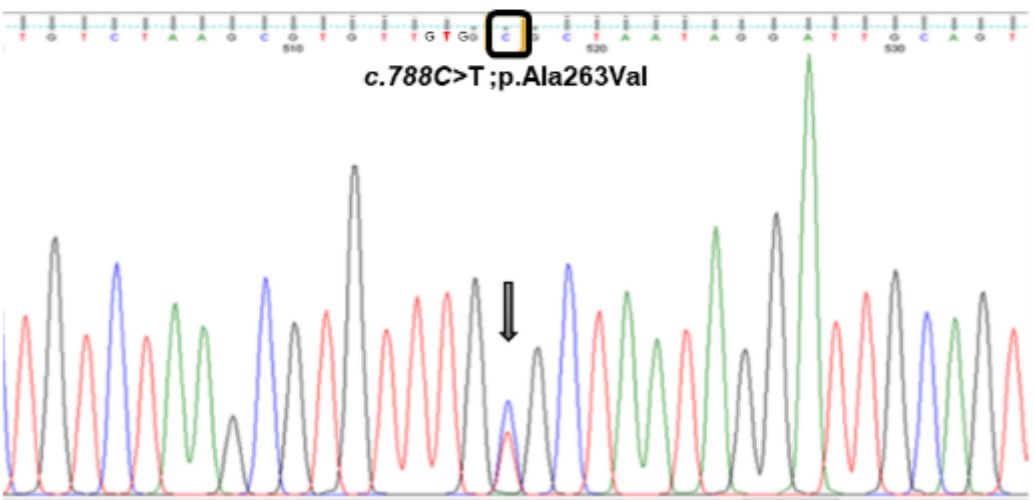


Figura 15 Secuenciación completa del genoma (WGS) para el diagnóstico molecular en un caso de Ataxia Episódica. A. *Árbol genealógico de una Familia con Ataxia Episódica. La flecha indica el caso índice y las figuras coloreadas a los miembros afectados. Los números representan a edad actual.La letra G refiere a la generación* ***B.*** *Resultado del análisis bioinformático realizado a partir de WGS en el caso índice. Se identifica una variante en heterocigosis en el gen SCN2A que genera un cambio de aminoácido de Alanina por Valina en la posición 263 de la proteína.* ***C.*** *Validación de la variante mediante Secuenciación de Sanger. En el electroferograma se observa la presencia de la variante identificada en la secuenciación del genoma.*

Caso N°4:

Paciente de 20 años, sin antecedentes familiares relevantes ni de consanguinidad, que inicia a los 7 años con un síndrome atáxico progresivo con franco deterioro en la capacidad de marcha y autovalidamiento en las actividades de la vida diaria. Al examen neurológico se destacaba la presencia de ataxia axial y apendicular (escala SARA de 28 puntos), disartria, y compromiso cognitivo severo. A los 19 años se agregó epilepsia con crisis parciales complejas. RMN con marcada atrofia pancerebelosa. Sin detección de expansiones anómalas en el gen *FXN*. Siguiendo nuestro algoritmo diagnóstico en individuos con ataxia esporádica, se procedió a la realización de TS, mediante técnicas de NGS. Se identificaron dos variantes en heterocigosis compuesta, en el gen *TTP1* NM_000391.3: c827A>T (p.Asp276Val) y NM_000391.3: c.887-10A>G ambas previamente reportadas en la literatura.

El fenotipo asociado a *TPP1* se ha expandido recientemente a una forma autosómica recesiva de ataxia cerebelosa lentamente progresiva previamente llamada ataxia autosómica recesiva tipo 7 (SCAR7), de la cual a la fecha del diagnóstico había escasos reportes en la literatura (76–79) y que actualmente se ha unificado como una presentación atípica de CLN2. Posteriormente, se determinó la ausencia de actividad enzimática de la Tripeptidil Peptidasa 1 en una muestra de sangre periférica, apoyando el diagnóstico de CLN2 en su variante atáxica.

Recientes estudios clínicos han demostrado la utilidad de una terapia de reemplazo enzimático, con enlentecimiento del compromiso motor y afectación del lenguaje (80) en pacientes con CLN2. caso destaca la importancia de la utilización de técnicas de nueva generación en el diagnóstico de ataxias recesivas e ilustra que formas atípicas de CLN2 deben ser consideradas en la lista de genes implicados en este grupo, ya que el manejo óptimo de pacientes con CLN2 se fundamenta en un diagnóstico certero temprano.

Gracias al diagnóstico certero, el paciente Inició tratamiento de reemplazo enzimático haciendo uso de infusiones intraventriculares de cerliponasa alfa en dosis de 300 mg cada 2 semanas. Se observó una mejoría de la frecuencia de crisis comiciales y una estabilización en la escala de sara con respecto al inicio del tratamiento. (sara actual de 31 puntos). Se destaca que, hasta la fecha del estudio, menos de 10 personas en el país con CLN2 habían recibido este tratamiento farmacológico.

4.1.3.4. Caso N°5: "Descubriendo imitadores genéticos: rol de la secuenciación exómica en el diagnóstico diferencial de las ataxias"

Mujer de 32 años, manifestaba desde la infancia pérdida progresiva de la agudeza visual bilateral. A los 8 años comienza con disartria y trastornos progresivos de la marcha, caracterizados por inestabilidad postural, con requerimiento desde los 24 años de silla de ruedas para movilizarse.

La hermana, de 31 años refería un cuadro clínico similar. Al examen neurológico se destacaba la presencia de visión bulto bilateral, ataxia axial y apendicular (escala de SARA de 26 puntos), hiperreflexia asociada a Babinski bilateral y apalestesia distal de miembros superiores e inferiores. Se realizó RMN de cerebro tanto a la paciente como a la hermana las cuales fueron normales. En el abordaje inicial ante un fenotipo e historia familiar sugestivo de AF se realizó el estudio molecular para el gen de *FXN* el cual fue negativo.

Al no tener otras características clínicas y/o de laboratorio orientadores de otro tipo de ataxia, se procedió a realizar un estudio de WES, mediante el cual se identificó la presencia de dos variantes en heterocigosis en el gen *OPA1*: NM_015560 c.G267T (*p. Trp89Cys*) y NM_015560 c.635_636del(Lys212fs), ésta última reportada como patogénica en la literatura biomédica y de esta manera se interpretó el cuadro como una forma de AF-*Like* secundario a variante en el gen *OPA1* (asociado al cuadro de atrofia óptica tipo 1) (**Figura 16**).

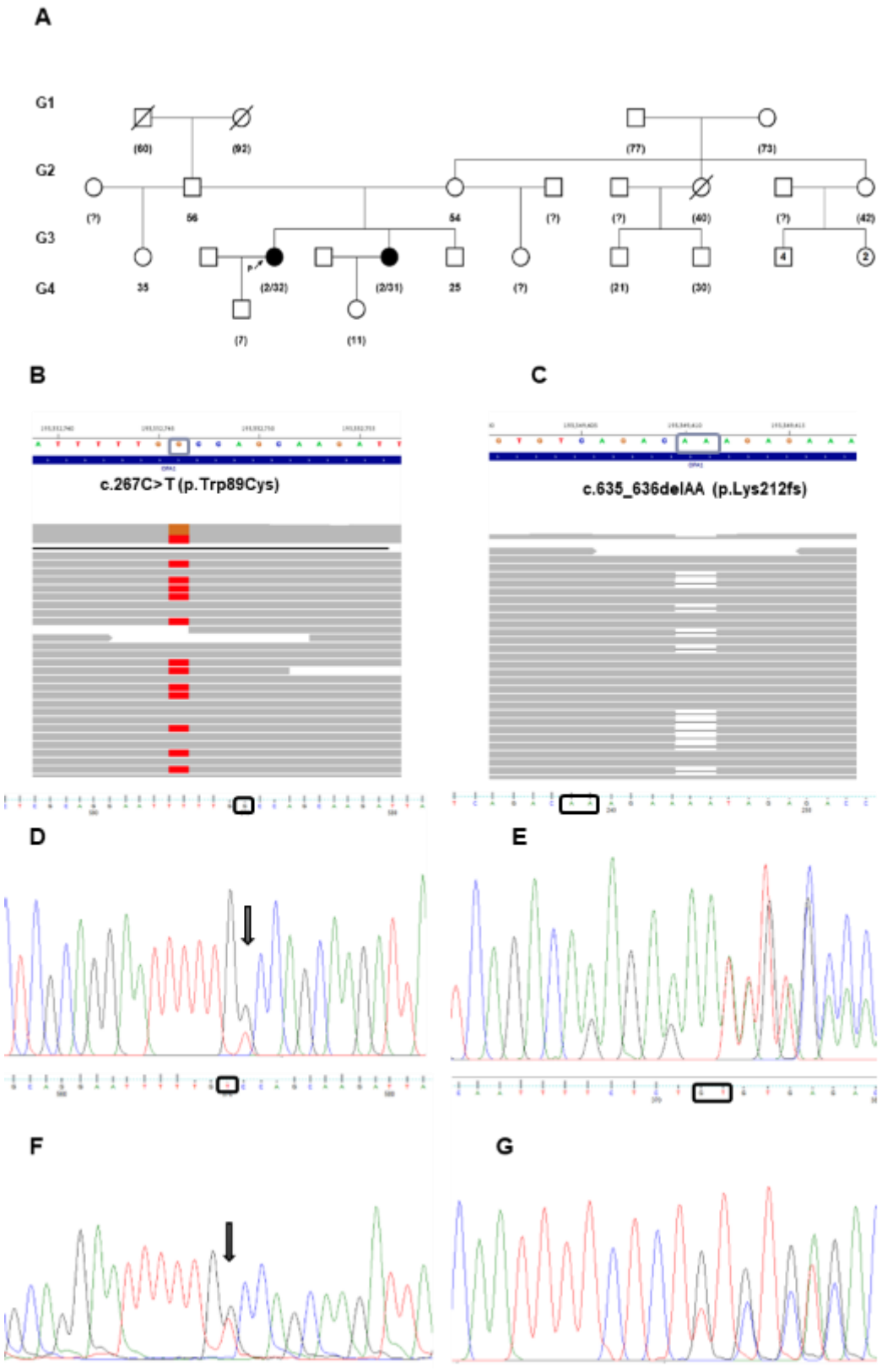


Figura 16. Utilización de la secuenciación de exoma completo (WES) como herramienta diagnóstica en un caso de OPA1 con fenotipo de presentación tipo ataxia de Friedreich-Like. A. *Árbol genealógico de la familia con Ataxia y atrofia óptica. Las figuras coloreadas indican los familiares afectados. Los números entre*

paréntesis representan en sujetos afectados: edad de inicio de síntomas/edad actual y en sujetos sanos: edad actual o edad de fallecimiento, según corresponda P: caso índice G: Generación. ***B-C****. Visualización de las variantes identificadas. Tras la secuenciación del exoma, las secuencias fueron alineadas contra el genoma de referencia (Gh37), y se identificaron y caracterizaron variantes. En el caso índice se identificaron dos variantes en heterocigosis el gen OPA1. Una variante no sinónima, que genera que un cambio de triptófano por cisteína en la posición 89 de la proteína (B) y una deleción de dos pares de base en la posición 635 del gen, que genera un corrimiento del marco de lectura (C).* ***D-E****. Validación de las variantes por Secuenciación de Sanger.* ***F-G.*** *Segregación familiar. Mediante secuenciación de Sanger, se denota la presencia de las dos variantes en la hermana afectada del caso índice. El amplicón de PCR fue secuenciado con el Primer Forward en los casos D, E y F y con el primer Reverse en el caso mostrado en G.*

4.1.3.5. Caso 6: "Utilidad del estudio traslacional en el diagnóstico genético de ataxia-telangiectasia (AT) con fenotipo atípico".

Mujer de 21 años fue referida a la unidad neurogenética a la edad de 17 años para el estudio de una ataxia de inicio infantil de progresión lenta. Nació de padres no consanguíneos y saludables. A los 5 años, caídas frecuentes y una progresiva falta de coordinación en su marcha llevaron a sus padres a consultar a una unidad de neurología pediátrica. Los resultados de la RMN mostraron atrofia cerebelosa que, junto con el hallazgo de una leve ataxia de miembros inferiores y disartria, condujeron a un diagnóstico probable de ataxia genética. La primera evaluación mostró una paciente ambulatoria completamente independiente con una leve ataxia axial y de miembros (puntuación de la Escala SARA: 7). Presentaba seguimiento suave fraccionado y movimientos sacádicos horizontales y verticales lentos e hipométricos. No hubo evidencia de apraxia oculomotora, y otros trastornos del movimiento estaban ausentes. Cabe destacar que no había telangiectasias oculares o cutáneas. El trastorno evolucionó durante los siguientes 4 años con una progresión leve de la ataxia (puntuación de SARA, 10) y la aparición de corea distal bilateral y una sutil distonía de la mano izquierda en los miembros superiores. El estudio bioquímico resaltó la presencia de alfafetoproteína sérica elevada (15 veces los valores normales) y niveles reducidos de inmunoglobulinas A y E. TS reveló la presencia de 2 variantes en forma heterocigota compuesta en el gen *ATM*: (NM_000051) c.1373G>A(p. Cys458Tyr) y c.8785_8788delAGGT(p. Arg2929Metfs * 2), no reportadas en la bibliografía. Para aumentar la certeza diagnóstica de este hallazgo, se realizó un estudio funcional en colaboración con la Dra. Marcela Gonzalez Cid, investigadora de la Academia de Medicina de la Ciudad de Buenos Aires. En este estudio, se evaluó la capacidad de reparación de la proteína ATM sobre roturas de doble cadena en el ADN mediante un ensayo de daño al ADN inducido por etopósido en linfocitos. Se identificó una frecuencia aumentada de aberraciones cromosómicas después del tratamiento ex vivo

con etopósido en la muestra de la paciente en comparación con el control sano, demostrando una deficiencia en los mecanismos de reparación del daño al ADN en la paciente y confirmando así el diagnóstico (**Figura 17**).

El caso reportado aquí destaca la importancia de combinar información de datos clínicos, genéticos y funcionales en el diagnóstico de ataxias progresivas y complejas. Aunque han existido descripciones iniciales de casos atípicos de AT, solo a partir de una amplia disponibilidad de estudios moleculares ha habido un mayor reconocimiento de estos fenotipos atípicos, como el reportado aquí. Además, la descripción del efecto patogénico de dos nuevas variantes en ATM amplía el espectro de mutaciones conocidas que causan este subtipo de AH.

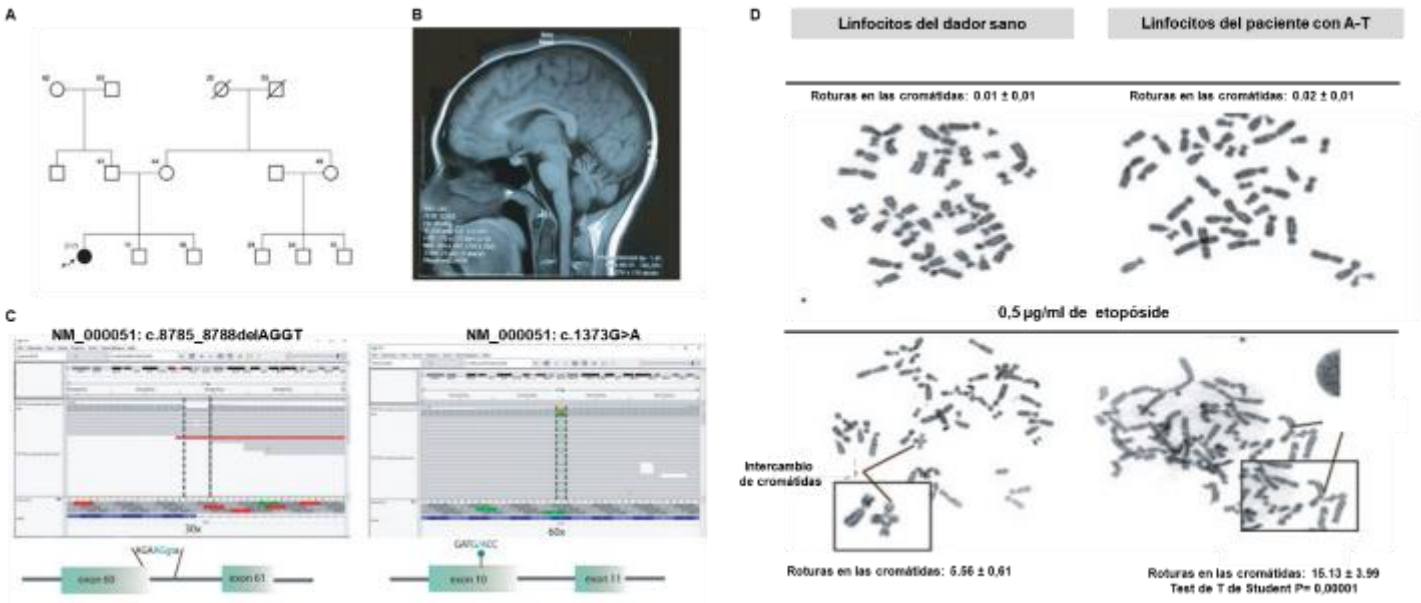


Figura 17. Resumen del caso atípico de ataxia telangiectasia (AT). A*. Gráfico de pedigree. La flecha indica el caso índice. Los números sobre la.s figuras corresponden a la edad actual/edad al inicio****. B.** *Imagen ponderada en T1 en sagital de resonancia magnética que muestra atrofia cerebelar****. C****. Alineación que muestra las variantes identificadas en el paciente.* ***D.*** *Aberraciones cromosómicas (tanto de rotura como de intercambio) después del tratamiento agudo con etopósido. Se muestra una imagen representativa de metafase que contiene aberraciones cromosómicas.* ***AT:****ataxia telangiectasia.*

La metodología integral aplicada a la cohorte de pacientes estudiada permitió un abordaje sistemático y exhaustivo para el diagnóstico molecular de las AH, combinando técnicas clásicas y de vanguardia en genética molecular. La estratificación de pacientes y el uso de algoritmos específicos facilitaron una aproximación personalizada al diagnóstico, mientras que la implementación de NGS y los estudios funcionales complementarios permitieron la identificación y caracterización de nuevas variantes genéticas asociadas a estas enfermedades.

4.2. Proyecto II (OE2): “Utilización de la secuenciación de tercera generación en el diagnóstico de las ataxias hereditarias”

La caracterización molecular de las regiones etiopatogénicas de las AH causadas or expansiones de TR representa un desafío debido a la heterogeneidad genética y fenotípica de estos trastornos, así como su baja frecuencia. Las tecnologías de secuenciación de tercera generación ofrecen nuevas oportunidades para abordar el estudio de estas enfermedades, al generar lecturas de mayor longitud y permitir la detección de diversos tipos de variantes, como expansiones de TR, SVs, SNVs y factores modificadores como las metilaciones, en un único ensayo.

En esta investigación, se exploraron diferentes enfoques para la captura de regiones de interés asociadas a AH causadas por TR, con el objetivo de realizar su posterior secuenciación. Los resultados se detallan a continuación.

4.2.1. Estrategia 1: Captura mediante el sistema CRISPR/cas9 o CRISPR/dcas9

Se utilizó una muestra de ADN de un paciente con AF para capturar una región específica del intrón 1 del gen *FXN*, que contiene la expansión GAA característica de esta enfermedad. Se diseñaron ARNg específicos para reconocer secuencias previas y posteriores a la repetición GAA. En base a los ensayos que se muestras en la **Figura 18A** se pudo ver que estos ARNg resultaron ser funcionales, logrando reconocer y cortar las regiones de interés. Además, se observó que el diseño experimental permitió capturar fragmentos del genoma y generar un templado circular para ser enriquecido mediante amplificación por círculos rodantes (RCA) únicamente en el templado tratado con el sistema CRISPR y el ligado de adaptadores (ver **Figura 18**).

Previo a la construcción de la biblioteca de secuenciación, los controles sugirieron un enriquecimiento de la región de interés en ambas aproximaciones (CRISPR/dCas9 y CRISPR/Cas9). Esto se determinó comparando los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos por qPCR en el gen objetivo (*FXN*) en relación a secuencias no objetivo. Se observaron valores menores de Ct en las regiones de interés cuando el ADN fue sometido al ensayo con CRISPR/Cas9 en relación con el ADN sin tratar. Sin embargo, no se observaron resultados concluyentes al analizar los datos de secuenciación mediante NGS. Aunque se identificaron lecturas de la región del intrón 1 del gen *FXN* en el visor de genomas (IGV), no se logró observar captura de la región específica correspondiente a la expansión GAA. Esto podría atribuirse a varios factores, como la baja fidelidad de la polimerasa phi29 utilizada en la amplificación por RCA, las limitaciones de la secuenciación de lecturas cortas para alinear secuencias repetitivas largas y la complejidad de la región seleccionada, que contenía más de 800 repeticiones GAA en el gen *FXN*.

Ante los resultados parcialmente satisfactorios, se buscó mitigar el sesgo introducido por la secuenciación de NGS. Para ello, se evaluó la viabilidad de emplear la secuenciación de tercera generación de ONT sobre el producto de la captura de CRISPR/cas. Sin embargo, no se logró construir la biblioteca de secuenciación, posiblemente debido a la incompatibilidad del producto de amplificación de RCA con este método. Posteriormente, se probaron protocolos de captura y secuenciación basados en el sistema CRISPR-Cas9 desarrollados por ONT, pero debido a las dificultades para obtener ADN de alta concentración y alto peso molecular (HMW), las librerías de secuenciación no cumplieron con los requisitos de concentración mínima requerida por el fabricante, por lo que se descartó esta aproximación de captura.

En resumen, aunque las aproximaciones iniciales con CRISPR/Cas9 y CRISPR/dCas9 mostraron un enriquecimiento preliminar de las regiones de interés, los desafíos técnicos asociados con la construcción de librerías y la secuenciación de regiones repetitivas complejas impidieron la obtención de resultados concluyentes. En consecuencia, se decidió enfocar los esfuerzos en las estrategias dos y tres, que involucraban la construcción de paneles de genes asociados a TR mediante PCR y muestreo adaptativo respectivamente.

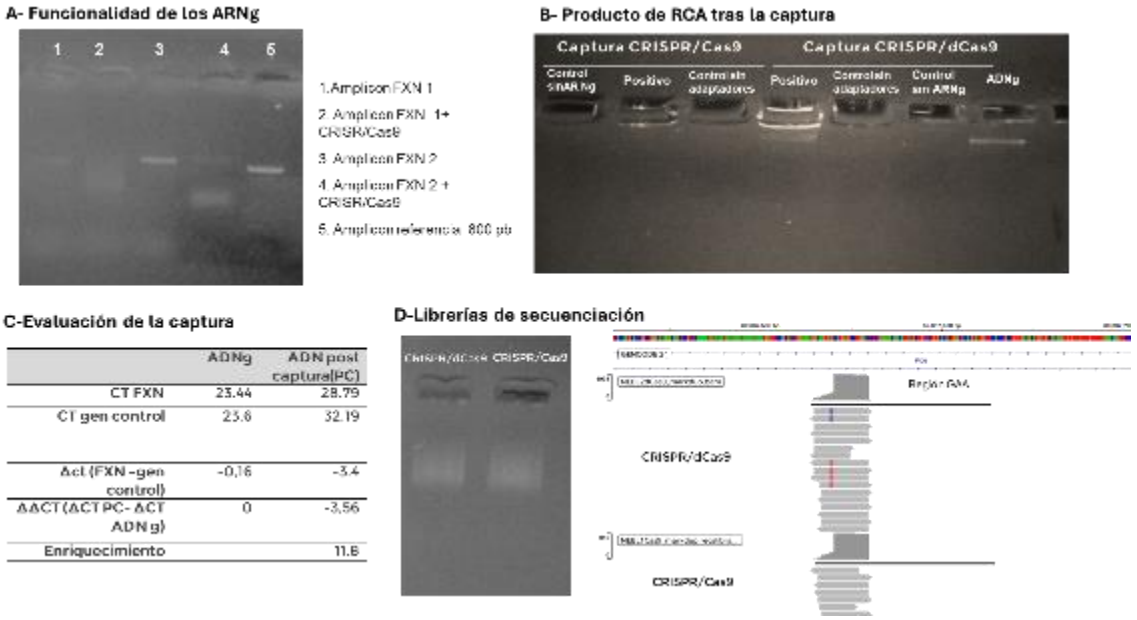


Figura 18. Resultados obtenidos durante las diferentes etapas de captura mediante el sistema CRISPR/Cas9 o CRISPR/dCas9 en un paciente con Ataxia de Friedreich*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de CRISPR-Cas9 con diferentes ARNg sobre amplicones. En las calles 2 y 4, se observa que en presencia del sistema CRISPR, los ARNg digieren el amplicón de PCR que contiene parte del intrón del gen FXN, demostrando su funcionalidad. **B**. Electroforesis en gel de agarosa del producto de RCA. Solo se observó amplificación en las muestras en las que se realizó el proceso completo de captura y ligación de adaptadores. **C**. Ejemplo del enriquecimiento observado para la reacción de RCA. Se evaluó el valor umbral (CT) de una región del intrón 1 en comparación con una región nuclear en ADN sometido al proceso de captura en relación con el ADN sin tratar, identificando un enriquecimiento de la región de interés. **D.** Librerías de secuenciación. En la imagen izquierda, se observa una corrida electroforética de la librería de secuenciación de ambos sistemas de captura. A la derecha, se muestra el alineamiento tras el análisis bioinformático.*

4.2.2. Estrategia 2: Secuenciación de un panel de genes generado por PCR mediante Oxford Nanopore Technologies

El estudio exploró la aplicabilidad de la tecnología de secuenciación de ONT para la caracterización de regiones repetitivas en ocho pacientes con diagnóstico molecular previo de AH (**Tabla 22**). Se desarrolló un protocolo que incluyó la amplificación por PCR de las regiones de interés, la construcción de librerías de secuenciación y la secuenciación en un dispositivo MinION Mk1B de ONT (**Figura 19**). Cada corrida de secuenciación, que incluyó múltiples fragmentos, tuvo una duración aproximada de tres horas.

Tabla 22. Resumen de los pacientes analizados en la estrategia 2.***SCA****: Ataxia espinocerebelosa.* ***EH****: enfermedad de Huntington.* ***AF****: Ataxia de Friedreich*.

Paciente	Diagnóstico	Tamaño de alelos (repeticiones)		Profundidad	Repeticiones		
		Análisis de fragmentos	ONT		Rango normal	Rango intermedio	Rango expandido
1	Posible SCA1	34, 39	33, 36	45000x	<36	35-38	>38
2	SCA2	22, 44	22, 45	150x	<31	31-34	>34-79
3	SCA3	24, 64	22, 65	97000x	<44	45-59	>59-87
4	SCA3	19, 63	19, 64	104000x	<44	45-59	>59-87
5	SCA3	10, 69	14, 67	80000x	<44	45-59	>59-87
6	SCA48	35, 39	35, 40	104000x	N/A	N/A	N/A
7	EH	10, 62	17, 63	17000x	<26	27-35	>36
8	AF	Expandido, Expandido	75, 75	100x	5-33	34-65	>66

Figura 19. Secuenciación utilizando dispositivos MinION MK1B y MK1C de Oxford Nanopore. Imagen superior: *La primera imagen muestra el dispositivo portátil de secuenciación MinION MK1B de Oxford Nanopore Technologies, conectado a una computadora que ejecuta el software de control y análisis de datos. La segunda imagen presenta una celda de flujo, que es el componente esencial donde se lleva a cabo la secuenciación en el MinION. La celda de flujo se conecta al dispositivo y contiene los nanoporos a través de los cuales se hace pasar el ADN para su secuenciación. La tercera imagen muestra un histograma que representa la distribución de las longitudes de las lecturas obtenidas durante la secuenciación de librerías preparadas a partir de productos de PCR, proporcionando información sobre la calidad y el rango de longitudes de las lecturas secuenciadas.* ***Imagen inferior:*** *La primera imagen en esta sección muestra el dispositivo MinION MK1C, una versión más reciente y avanzada del secuenciador. Este dispositivo cuenta con una pantalla táctil integrada, lo que le permite funcionar de manera independiente sin necesidad de estar conectado a una computadora. La segunda imagen ilustra el proceso de carga de la librería de ADN en la celda de flujo del MinION MK1C, preparándolo para la secuenciación. La tercera imagen presenta un histograma que muestra la distribución de las longitudes de las lecturas obtenidas durante la secuenciación utilizando la técnica de muestreo adaptativo (adaptive sampling). Este enfoque permite seleccionar y secuenciar específicamente regiones genómicas de interés definidas previamente en un archivo BED. El histograma muestra que la mayoría de las lecturas se agrupan alrededor de 815 pares de bases (pb), lo cual se debe a que el muestreo adaptativo selecciona y retiene principalmente las secuencias que se alinean con las regiones objetivo del archivo BED, descartando el resto de las lecturas no relevantes. Esta capacidad de enfocarse en regiones específicas optimiza el uso de los recursos de secuenciación y permite obtener una cobertura más profunda en las regiones de interés.*

El análisis bioinformático inicial, que incluyó la visualización del alineamiento en los archivos BAM resultantes (**Figuras 20-23**), confirmó la secuenciación de todas las regiones objetivo con lecturas largas en relación con las 150-300 pb leídas en una secuenciación de NGS (**Figura 23 B**). Este hallazgo respaldó la viabilidad de desarrollar un panel de genes para la secuenciación rápida de las AH más frecuentes.

Los resultados específicos para cada paciente se detallan a continuación:

La Paciente 1 fue remitida al consultorio de Neurogenética para una evaluación más exhaustiva, tras un estudio previo que sugería la presencia de un alelo intermedio de 39 repeticiones para la SCA1. Este hallazgo inicial requería un análisis más profundo de la secuencia del gen *ATXN1*, responsable de esta condición, para determinar con precisión el número de repeticiones CAG y la presencia de posibles interrupciones. La secuenciación mediante tecnología ONT se aplicó para caracterizar detalladamente la región repetitiva del gen *ATXN1*. Se identificaron dos alelos (33 y 36 repeticiones) en rango normal, sin interrupciones CAT significativas en la expansión CAG (**Figura 20**). Aunque estos resultados no clarificaron el diagnóstico, demostraron la capacidad de la técnica para detectar y cuantificar repeticiones.

Los Pacientes 2 y 7 presentaron alelos del tamaño esperado, concordantes con su diagnóstico previo, sin detectarse secuencias interruptoras en los alelos expandidos (**Figura 21**). Esto validó la capacidad de la técnica para confirmar diagnósticos establecidos.

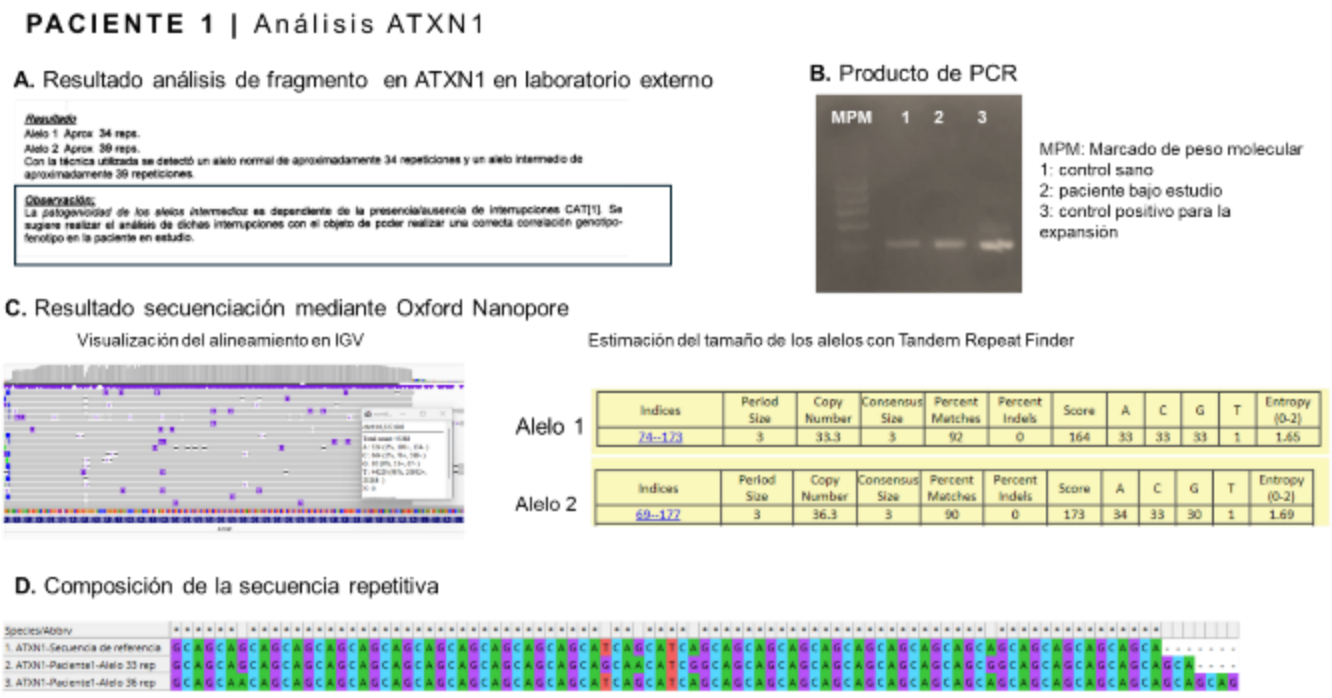


Figura 20. Análisis genético de la paciente 1: Caracterización de expansiones repetitivas de ADN. ***A.*** *Informe del análisis de fragmento.* ***B****. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región objetivo a ser secuenciados mediante ONT.* ***C****. Izquierda: Imagen del alineamiento de la región CAG del gen ATXN1 obtenida tras la secuenciación. Derecha: resultado del análisis con Tandem Repeat Finder, que identifica dos alelos, uno con 33 repeticiones y otro con 36 repeticiones* ***D.*** *Alineamiento de los alelos del paciente con respecto a la secuencia de referencia. No se observan diferencias en la composición de la región repetitiva entre los alelos del paciente y la secuencia de referencia.*

Los Pacientes 3, 4 y 5, pertenecientes a una familia con SCA3, mostraron resultados consistentes con el análisis de fragmentos previo, pero con hallazgos adicionales significativos. Los Pacientes 3 y 5, que presentaban paraparesia espástica y parkinsonismo asimétrico respondedor a L-Dopa, mostraron secuencias CAA intercaladas entre las repeticiones CAG. En contraste, el Paciente 4, con ataxia axial y apendicular, no presentó estas interrupciones (**Figura 22**). Estos hallazgos sugieren una posible correlación entre la presencia de interrupciones y la variabilidad fenotípica observada en esta familia, subrayando el potencial de la secuenciación ONT para proporcionar información relevante sobre la estructura de las repeticiones.

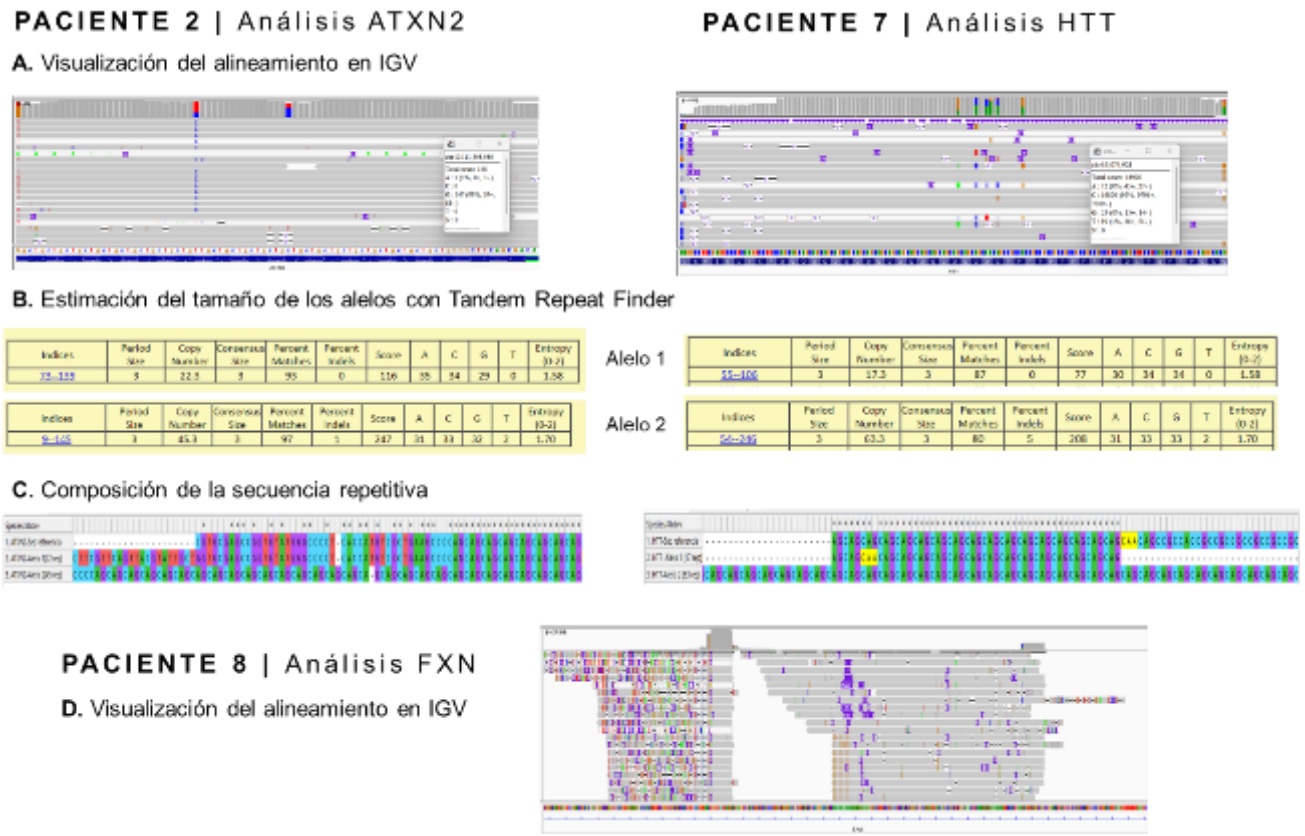


Figura 21. Análisis genético de los pacientes 2, 7 y 8 : Caracterización de expansiones repetitivas de ADN. A. Imagen del alineamiento de la región CAG del gen ATXN2 y HTT obtenida tras la secuenciación. **B.** Resultado del análisis con Tandem Repeat Finder. **C**. Alineamiento de los alelos del paciente con respecto a la secuencia de referencia. No se observan diferencias en la composición de la región repetitiva entre los alelos de los pacientes y la secuencia de referencia. **D.** Imagen del alineamiento del intrón 1 del gen *FXN* en el paciente 8.

El caso del Paciente 6 resultó particularmente interesante. Previamente diagnosticado con SCA48 debido a una variante missense en heterocigosis en el gen *STUB1* (81), el análisis ONT del gen *TBP* identificó un alelo con 40 repeticiones, considerado intermedio. Este hallazgo adquiere relevancia a la luz de estudios recientes(82–84) que sugieren una interacción genética entre STUB1 y TBP, cuestionando la existencia de SCA48 como una enfermedad monogénica. La publicación más reciente (82) concluye que los alelos intermedios TBP40-49 actúan como modificadores de la enfermedad SCA48, siendo importantes factores de riesgo que influyen tanto en el desarrollo de la demencia con afectación frontal como en la supervivencia en pacientes con SCA48. Esto tiene importantes consecuencias para el consejo genético y el seguimiento del paciente. En cuanto a la

composición de la repetición, los alelos de este paciente mostraron una estructura compleja, incluyendo repeticiones CGG no descritas previamente en la literatura, lo que subraya la necesidad de un análisis más detallado para descartar posibles errores inherentes a la técnica de secuenciación (**Figura 23**).

En cuanto al gen *FXN*, asociado a la AF, se observó una disminución de la cobertura en la región de expansión GAA, probablemente debido a su alto contenido de GC (**Figura 21)**. Esta limitación técnica impidió el análisis preciso del tamaño y composición de los alelos en este gen, señalando un área de mejora para futuras aplicaciones de la técnica.

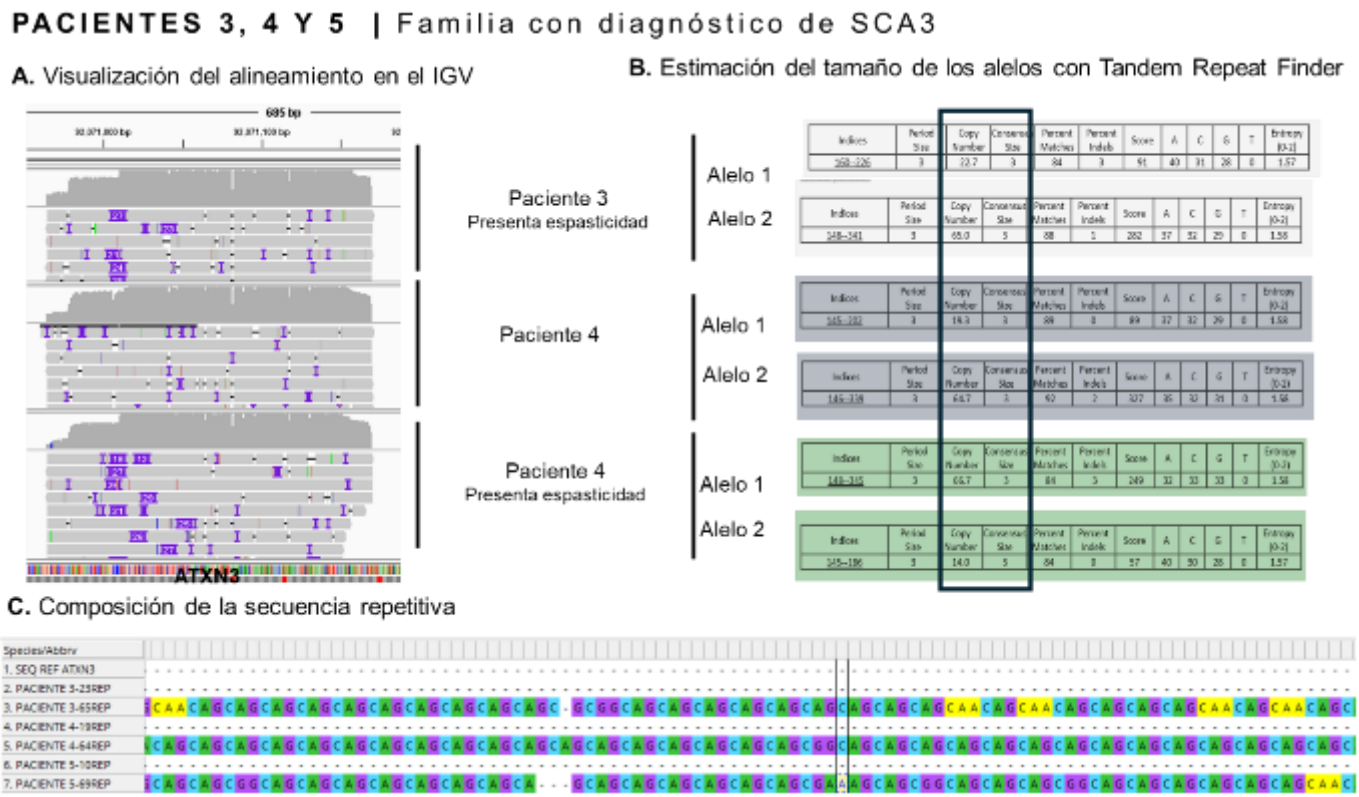


Figura 22. Análisis genético de la familia con diagnóstico de SCA3: caracterización de expansiones repetitivas de ADN. enfocándose en la identificación y caracterización de expansiones repetitivas de ADN*. **A**. Imagen del alineamiento de la región CAG del gen ATXN2 y HTT obtenida tras la secuenciación.* ***B.*** *Resultado del análisis con Tandem Repeat Finder.* ***C.*** *Alineamiento de los alelos del paciente con respecto a la secuencia de referencia. En los pacientes con espasticidad se observa interrupciones CAA.*

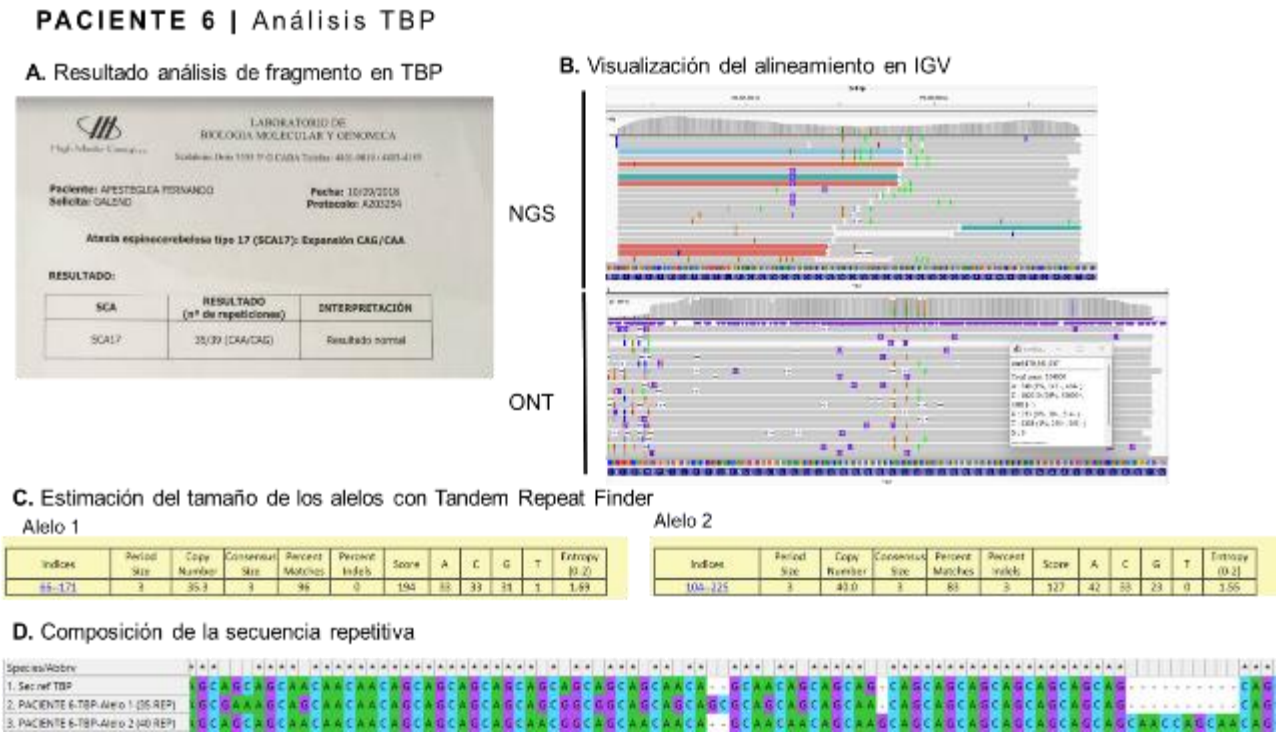


Figura 23. Análisis genético de la paciente 6: Caracterización de expansiones repetitivas de ADN. A. *Informe del análisis de fragmento* ***B****. Visualización del alineamiento de la región CAG del gen TBP: Se muestra una comparación entre la cobertura y longitud de lectura obtenida mediante secuenciación de próxima generación (NGS) y la tecnología Oxford Nanopore (ONT). Esta imagen destaca la capacidad superior de ONT para capturar lecturas más largas y continuas en regiones repetitivas.* ***C.*** *Resultado del análisis con Tandem Repeat Finder: Ofrece una representación gráfica y numérica de la estructura de las repeticiones identificadas, incluyendo el número de repeticiones y posibles interrupciones en la secuencia.* ***D.*** *Alineamiento de los alelos del paciente con la secuencia de referencia*

En conjunto, estos resultados demuestran el potencial significativo de la secuenciación ONT para la caracterización detallada de regiones repetitivas en genes asociados a AH. La técnica no solo permitió determinar el tamaño de las expansiones, sino también identificar interrupciones potencialmente significativas para el fenotipo clínico. Sin embargo, también se evidenciaron limitaciones importantes, como la necesidad de un análisis bioinformático más manual y desafíos en regiones con alto contenido de GC.

La capacidad de realizar la construcción de la librería y la secuenciación en un mismo día subraya el potencial de esta tecnología para mejorar la eficiencia diagnóstica. No obstante, se requieren futuros desarrollos en los protocolos y herramientas de análisis bioinformático para superar

las limitaciones actuales y consolidar el papel de esta tecnología en la investigación y diagnóstico de enfermedades genéticas complejas.

4.2.3. Estrategia 3: Aplicación del muestreo adaptativo con Oxford Nanopore Technologies para el diagnóstico molecular de un paciente con ataxia episódica tipo 2

En este estudio se empleó un paciente previamente diagnosticado con Ataxia Episódica tipo 2 (AE2) como control para explorar el muestreo adaptativo en la secuenciación de regiones genómicas asociadas a AH, causadas por expansiones de TR o variantes puntuales. La secuenciación se realizó utilizando el dispositivo portátil MinION Mk1C de ONT, que solo requiere conexión eléctrica para su funcionamiento (**Figura 19**).

La librería se procesó durante aproximadamente 72 horas, obteniéndose casi 38 gigabases (Gbs) de información y 2.3 millones de lecturas que mapearon con las regiones de interés en más del 90%. Cabe destacar que la tecnología ONT permitió obtener lecturas largas, lo cual es particularmente ventajoso para la caracterización de expansiones repetitivas, ya que permite capturar la secuencia completa de la expansión en una sola lectura, facilitando la determinación precisa del tamaño y la composición de las repeticiones.

El muestreo adaptativo demostró ser altamente efectivo para capturar las regiones genómicas de interés. Al comparar la profundidad de cobertura de estas regiones en la muestra secuenciada con este método frente a una muestra secuenciada sin enriquecimiento, se observó una notable diferencia (**Figura 24**). La muestra secuenciada mediante muestreo adaptativo mostró una mayor cantidad de lecturas en las regiones de interés y una caída en la profundidad de cobertura en las secuencias lindantes. En contraste, el enfoque sin enriquecimiento presentó una profundidad de cobertura similar en las regiones objetivo (on target) y no objetivo (off target).

Aunque la profundidad de cobertura obtenida fue inferior a la alcanzada con métodos de secuenciación de NGS, las regiones pudieron ser identificadas y analizadas utilizando los algoritmos desarrollados por ONT. La cobertura relativamente baja se atribuye en parte a la calidad de la librería y a la naturaleza intrínseca de la técnica, donde las regiones "off target" deben leerse parcialmente para ser luego descartadas durante la secuenciación.

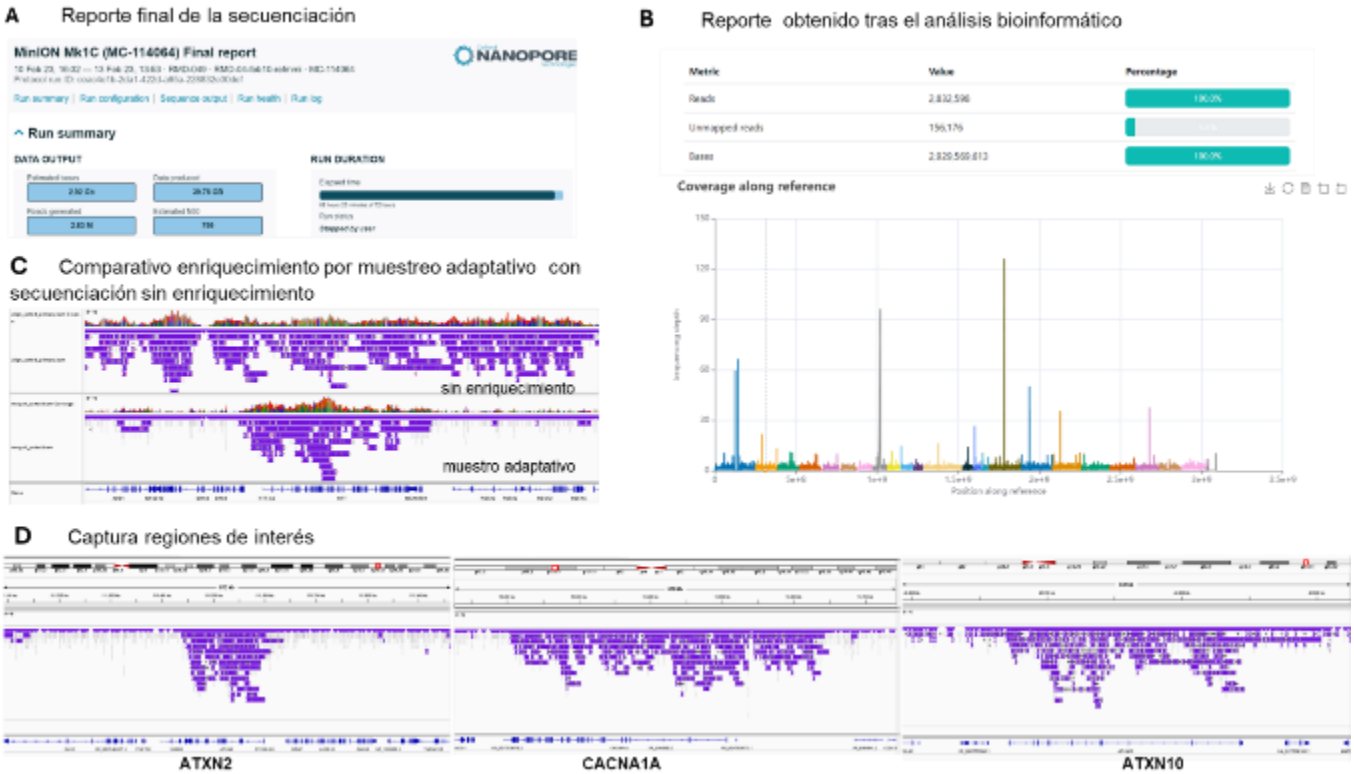


Figura 24. Evaluación del rendimiento del muestreo adaptativo mediante secuenciación con Oxford Nanopore Technologies en una muestra de paciente control. A. *Métricas de la corrida de secuenciación en el dispositivo MinION Mk1C.* ***B.*** *Resumen de las lecturas y bases mapeadas, y cobertura genómica obtenida.* ***C.*** *Comparación de la cobertura en regiones objetivo y fuera de objetivo entre los enfoques con y sin muestreo adaptativo.* ***D****. Ejemplos de cobertura detallada en regiones de interés, demostrando el enriquecimiento logrado mediante muestreo adaptativo para el panel virtual.*

En la muestra control utilizada, el muestreo adaptativo y el análisis bioinformático subsiguiente permitieron identificar la variante patogénica previamente asociada con la ataxia episódica tipo 2 (AE2) en el paciente (**Figura 25**). Además, se logró genotipificar los genes asociados con las expansiones de TR en AH, simplificando significativamente el proceso de preparación de muestras en comparación con los métodos convencionales.

En resumen, este enfoque de panel virtual personalizado, basado en el muestreo adaptativo y el análisis bioinformático adecuado, ofrece una perspectiva prometedora para el estudio de trastornos heterogéneos y complejos como las AH. Facilita la exploración de diferentes tipos de variantes genéticas relevantes en una sola corrida de secuenciación. Estos resultados subrayan la efectividad de la metodología empleada en la detección de variantes genéticas en las regiones de

interés, respaldando su potencial utilidad en el diagnóstico molecular de las AH y otras enfermedades genéticas relacionadas. La combinación de la secuenciación de tercera generación con la captura de regiones de interés mediante muestreo adaptativo emerge como una estrategia prometedora en el ámbito de la genética clínica, ofreciendo una solución integral para el análisis de variantes complejas y repeticiones expandidas en un solo experimento.

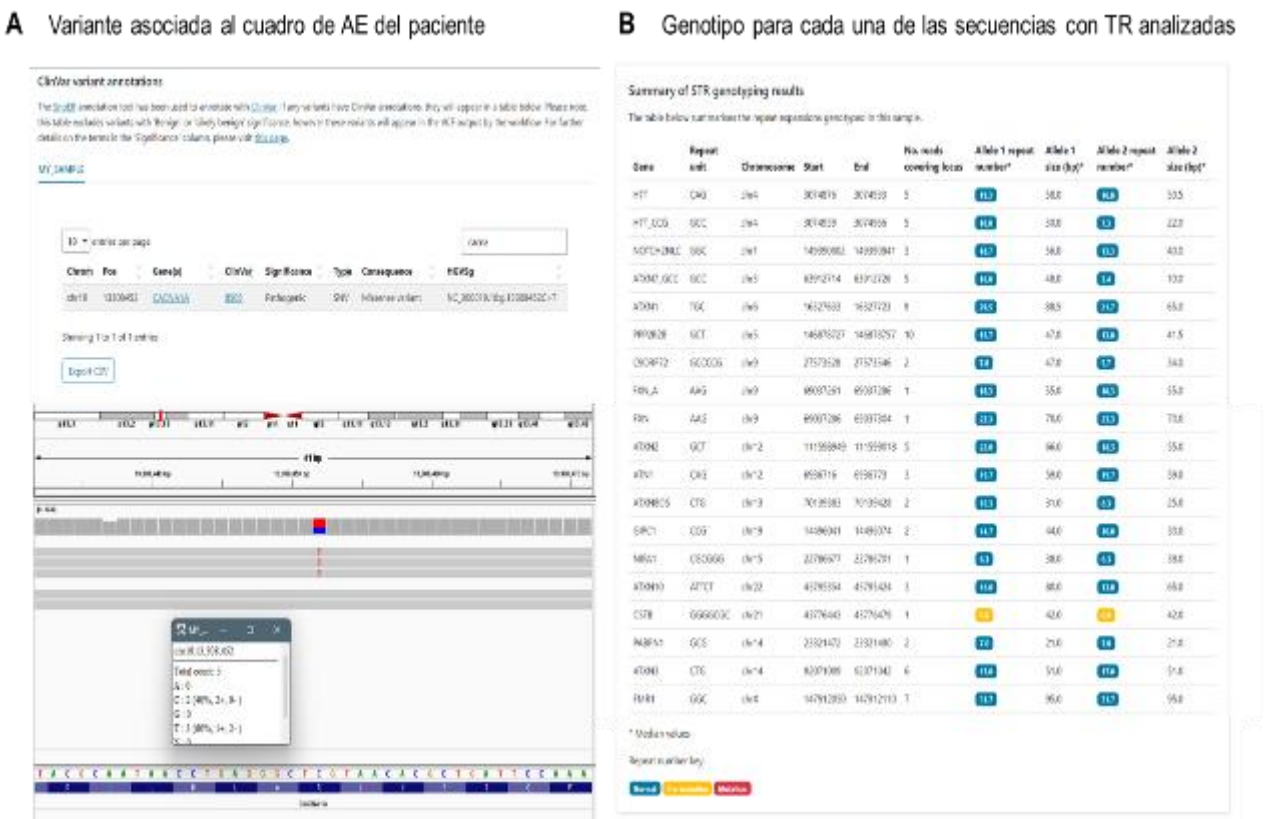


Figura 25. Resultados del diagnóstico molecular mediante muestreo adaptativo en un paciente con Ataxia Episódica tipo 2 (AE2). A. *Variante asociada al cuadro de AE2 del paciente. Se muestra la anotación de la variante patogénica c.4261A>G (p. Thr1421Ala) en el gen CACNA1A, identificada mediante el análisis bioinformático. La imagen incluye la visualización del alineamiento de lecturas en la región genómica correspondiente.* ***B.*** *Genotipo para cada una de las secuencias con repeticiones en tándem (TR) analizadas. La tabla resume los resultados del genotipado de expansiones de TR en diversos genes asociados a ataxias hereditarias y otros trastornos neurológicos. Se detallan el gen, la unidad de repetición, la localización cromosómica, el número de lecturas que cubren el locus, y el tamaño estimado de los alelos.*

5. DISCUSIÓN

5.1. Proyecto I (OE1): “Desarrollo de una estrategia de diagnóstico genético-molecular de las ataxias hereditarias”

El trabajo realizado permitió caracterizar una población pediátrica y adulta de pacientes con ataxias heredo-degenerativas, logrando un diagnóstico genético en un número significativo de individuos. Se identificó el defecto genético en al menos un tercio de los pacientes incluidos en el Programa de Ataxias Crónicas y Progresivas. Esto fue posible gracias al desarrollo de un proceso diagnóstico basado en un enfoque secuencial, guiado por las hipótesis surgidas tras una caracterización fenotípica individualizada y exhaustiva de cada caso. Este enfoque académico demostró ser útil tanto en términos de rendimiento diagnóstico como en la economía de recursos.

La serie de pacientes presentada es la más extensa reportada hasta la fecha en nuestro país. Los resultados obtenidos proporcionan información epidemiológica valiosa y útil, ofreciendo un conocimiento más preciso de los subtipos más prevalentes de ataxias en nuestra región y de sus principales características fenotípicas. Además, permiten un uso más racional de los recursos disponibles para el abordaje diagnóstico genético de pacientes con ataxia.

Además, se presenta evidencia de la utilidad de los ensayos basados en secuenciación de nueva generación en pacientes con fenotipos no característicos o complejos, o cuando se han descartado previamente los subtipos más frecuentes de AH. Además de su alto rendimiento diagnóstico, su uso a menudo evita pruebas no específicas innecesarias, con el beneficio de reducir costos y acortar la denominada "odisea diagnóstica" para estos pacientes complejos.

En pacientes con fenotipos no característicos y/o complejos, o cuando los estudios moleculares para las formas más frecuentes de ataxias resultaron insuficientes, el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) demostró ser de gran utilidad. Se logró el diagnóstico en 17 de los 26 pacientes estudiados mediante NGS, identificándose 14 subtipos diferentes de ataxias. Esto resalta la notable heterogeneidad genética y fenotípica que caracteriza a estos trastornos. En conjunto, estos resultados reafirman la eficacia de estas técnicas en el abordaje diagnóstico de estas enfermedades. La tecnología NGS proporciona una herramienta rápida y efectiva para identificar una etiología definida, incluso en ausencia de signos clínicos evidentes. Además de mejorar la precisión diagnóstica, estas tecnologías contribuyen a reducir tanto los costos como los tiempos involucrados, al minimizar la necesidad de realizar múltiples estudios complementarios y, por ende, acortar lo que se conoce comúnmente como la "odisea diagnóstica" (85–87).

Se destaca también que, en todos los casos analizados, las variantes genéticas identificadas mediante esta tecnología y que condujeron al diagnóstico genético se localizaron en los genes incluidos en el panel multigénico virtual diseñado para el análisis bioinformático (consulte el Anexo

3). Este hallazgo valida la utilidad de los paneles multigénicos en el diagnóstico preciso de AH, cumpliendo así uno de los objetivos principales de esta tesis.

En el análisis de series de casos similares en otros países, se observan tasas de éxito diagnóstico comparables a las obtenidas por nuestro grupo. Brusco y colaboradores, en una serie de 225 pacientes con ataxia, lograron un diagnóstico genético de SCAs en el 49% de los casos (88). Un estudio multicéntrico en Estados Unidos y Canadá encontró la causa genética en el 62% de las 361 familias con ataxia estudiadas (89). Estos resultados son similares a los observados en nuestro trabajo, especialmente en casos con antecedentes familiares. Otro estudio que incluyó 864 sujetos con sospecha de ataxia espinocerebelosa reportó un porcentaje diagnóstico del 30.8% (90). Además, un trabajo reciente realizado en Estados Unidos con una cohorte de 785 pacientes atendidos en una clínica terciaria de ataxia durante cinco años (2016-2021) encontró que, de los 106 pacientes sometidos a pruebas genéticas, se alcanzó un diagnóstico molecular confirmatorio en el 41.5% de los individuos (91). Estos hallazgos reflejan resultados muy similares a los descritos en nuestra serie, reafirmando la eficacia de los enfoques diagnósticos utilizados y la utilidad de las pruebas genéticas en el diagnóstico de AH

SCA2 fue el subtipo de ataxia dominante más prevalente en la serie de pacientes analizada, identificándola en el 36% de los pacientes con SCA diagnosticadas. SCA3 es la forma más frecuente encontrada globalmente (92,93) y la segunda localmente; a su vez, son reconocidas regiones en las cuales predominan subtipos determinados de SCAs, tal es el ejemplo de SCA2 en Cuba, Italia y República Checa (92,93), SCA-10 en México (61) o SCA-3 en Portugal, Brasil, China, Francia, Alemania, España y Holanda (92–95). Nuestra observación de una mayor prevalencia local de SCA2 y SCA3 podría depender de la importante corriente migratoria proveniente de países europeos en los últimos dos siglos, reproduciendo en Argentina una prevalencia de SCAs similar a la observada en otras series de países del viejo mundo (93,96).

Si algo caracteriza a las SCAs es la amplia variabilidad fenotípica exhibida, merced a la frecuente concomitancia de sintomatología extra-cerebelosa asociada al síndrome atáxico. Algunas de estas características son de utilidad diagnóstica, ya que pueden resultar distintivas. En forma similar que otros autores (97,98), observamos que la presencia de movimientos sacádicos horizontales marcadamente lentos es una característica muy frecuente en sujetos con SCA2, donde resultó un hallazgo en el 80% de los pacientes, y que la presencia de parkinsonismo y/o polineuropatía son manifestaciones clínicas observables en la mitad de los sujetos con SCA3. La presencia de atrofia cerebelosa en las RMN fue común en todos los subtipos de SCAs. Se encontró que, cuando la atrofia se extendía a las estructuras del tronco encefálico y se acompañaba de cambios en la intensidad de la señal pontina en T2W, era más probable un diagnóstico de SCA2, como se ha descrito en otras series (99). Como se describió recientemente en pacientes con SCA48

(100), se identificó en nuestro paciente con una mutación dominante en STUB1 la presencia de hiperintensidad en T2WI en los núcleos dentados (el “signo del cangrejo”)

AF es la ataxia recesiva más prevalente en todo el mundo (42,101,102), de igual manera, ha sido la principal forma encontrada en nuestra población, el 65% de las ataxias recesivas diagnosticadas en nuestra serie son de este tipo. Cabe destacar la presencia de formas atípicas de presentación en 5 casos, caracterizados por formas de inicio tardío o fenotipos no clásicos. Es así, entonces que, en todo sujeto con sospecha de ataxia recesiva, independiente de la edad de presentación**,** se debe considerar a la AF como un principal diagnóstico diferencial (103,104). En el resto de los sujetos diagnosticados con otras formas de ataxias recesivas, se mencionan dos características importantes a destacar: por un lado, la amplia heterogeneidad genética en este grupo de ataxias, habiéndose descripto 12 genes distintos dentro de los 17 sujetos diagnosticados, y por otro lado la utilidad del empleo de herramientas de secuenciación masiva en este grupo de entidades, las cuales permitieron arribar a un diagnóstico en un 65% pacientes.

Los casos destacados resultan paradigmáticos e ilustrativos por distintos motivos expuestos y resumidos a continuación. El primer caso resalta la importancia de la combinación de una adecuada caracterización clínica y un correcto abordaje genético para poder confirmar un diagnóstico molecular (63,105,106). Ante la presencia de un sujeto con un fenotipo clásico para AF, y el hallazgo de un único alelo expandido mediante técnica de PCR en el estudio convencional para AF; la posterior secuenciación del gen *FXN* mediante técnica de Sanger, nos permitió identificar la presencia de una variante sin sentido en el exón 3 del gen *FXN* y poder confirmar nuestra hipótesis diagnóstica de AF, en este caso en heterocigosis compuesta.

El segundo caso representa la gran heterogeneidad fenotípica del espectro de las SCAs, las cuales inclusive pueden presentarse sin signos claros de afección cerebelosa (107,108). En nuestro caso ante un paciente con un cuadro de paraparesia espástica hereditaria, el poder evaluar a otro familiar afectado permitió determinar la presencia de disfunción cerebelosa en el mismo, redireccionar el abordaje diagnóstico hacia el espectro de ataxias cerebelosas y poder confirmar un diagnóstico molecular de SCA3 en la familia.

El tercer caso representa un fenotipo lo suficientemente complejo como para requerir una aproximación más amplia, factible de análisis a través de una técnica de nueva generación, en este caso el empleo de una secuenciación completa de su genoma, que en un sólo paso, permitió la obtención de un diagnóstico molecular. Esto nos permitió confirmar una entidad patológica definida, reducir tiempos, costos y además, en base a las características fisiopatológicas de la variante identificada en este caso, modificar de forma más precisa el esquema terapéutico instaurado en el caso índice y otros afectados con el uso de un fármaco clásico y de bajo costo como es la fenitoína, pero con un alto grado de certeza de eficacia terapéutica (109).

El cuarto caso demuestra que las presentaciones atípicas de CLN2, asociadas a mutaciones en el gen *TPP1*, deben ser consideradas dentro de los diagnósticos diferenciales del espectro de ataxias autosómicas recesivas. Actualmente, existen terapias de reemplazo enzimático aprobadas para CLN2 que han logrado modificar el curso evolutivo de la enfermedad (80). Además, este caso reafirma la utilidad de las técnicas de secuenciación de nueva generación en el abordaje diagnóstico de pacientes con AH, permitiendo un diagnóstico preciso y oportuno de enfermedades potencialmente tratables.

El quinto caso ilustra la utilidad de herramientas de secuenciación masiva en paralelo en el estudio de las AH mediante el ejemplo de una paciente con un fenotipo AF-*like,* donde mediante la realización de secuenciación de su exoma, nos permitió identificar la presencia de alteraciones en *OPA1*, un gen infrecuentemente causante de ataxias recesivas, ampliando así el espectro fenotípico de este grupo de entidades (110).

El sexto caso destaca la importancia de un estudio traslacional que combine información de estudios clínicos, genéticos y funcionales en el ejercicio diagnóstico de ataxias progresivas y complejas, sobre todo en aquellos casos de presentación atípica.

La implementación de un programa sistematizado de evaluación clínica y molecular en una población de pacientes con sospecha de AH, mediante el empleo de recursos propios basados en un ámbito de investigación, demostró ser exitosa en términos de la alta tasa de diagnósticos obtenidos. La configuración de un algoritmo permite facilitarle al médico tratante un mejor abordaje de este complejo grupo de patologías, optimizando los recursos diagnósticos y acortando la denominada “odisea diagnóstica”. El acceso a un causante etiológico deriva en acciones médicas que se desprenden de él, a través de la detección temprana o el seguimiento de las diferentes comorbilidades. Igualmente importante es, a partir del diagnóstico molecular, la posibilidad de brindar un adecuado asesoramiento genético, mediante la información sobre riesgos de recurrencia familiar y pronóstico evolutivo específico.

Por otro lado, cada día se van descubriendo y describiendo mayor número de entidades neurogenéticas potencialmente tratables, por lo cual es fundamental el poder arribar a un diagnóstico certero en los sujetos que se podrían beneficiar con un tratamiento específico (111–113). El arribo a una mayor proporción de diagnósticos moleculares expande el conocimiento del espectro clínico del amplio mundo de las AH, configurando un registro del defecto causal individualizado para futuras oportunidades terapéuticas en actual desarrollo (102,114).

El vasto conocimiento que ha surgido en los últimos años en la genética de las AH posiciona a la genómica en un papel cada vez más imprescindible como herramienta de uso diagnóstico, esto deriva en la creciente necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas con el fin de evitar la

significativa morbimortalidad que originan estas entidades(112). Sin embargo, aún el camino por recorrer no es menos vasto, por lo que se debe continuar trabajando en nuevos métodos que permitan un rápido diagnóstico de las AH, a fin de reducir el impacto individual y familiar de estas devastadoras condiciones neurodegenerativas.

5.2. Proyecto II (OE2): “Utilización de la secuenciación de tercera generación en el diagnóstico de las ataxias hereditarias”

El diagnóstico molecular preciso de las AH y otros trastornos neurogenéticos asociados a expansiones de TR ha representado históricamente un desafío significativo en el campo de la genómica clínica. El estudio llevado a cabo en esta tesis exploró el potencial de las tecnologías de secuenciación de LRS, específicamente ONT, para abordar las limitaciones diagnósticas de las AH. Los resultados obtenidos ofrecen perspectivas valiosas sobre las ventajas y desafíos de estas tecnologías emergentes en el contexto del diagnóstico molecular de estos complejos trastornos genéticos.

La capacidad de ONT para generar lecturas más largas demostró ser una ventaja significativa sobre las tecnologías de secuenciación de NGS, especialmente en el análisis de regiones altamente repetitivas. Esta observación es consistente con la literatura científica reciente, que subraya la superioridad de las tecnologías de secuenciación de ONT en el manejo de regiones genómicas complejas y repetitivas (16,115,116). Estas tecnologías para capturar expansiones de TR en su totalidad ofrecen una resolución sin precedentes en la caracterización de estas regiones críticas para el diagnóstico de AH. Al abarcar regiones repetitivas completas en una sola lectura se evitan los problemas de alineamiento que a menudo se encuentran con las lecturas cortas. Esto es particularmente crucial en el contexto de las AH, donde las expansiones de TR pueden extenderse por cientos o miles de bases, superando la longitud de las lecturas generadas por las tecnologías NGS convencionales.

Los enfoques metodológicos utilizados para cumplir con el OE2 exploraron tres estrategias principales: captura mediante CRISPR/Cas9, construcción de paneles de genes mediante PCR y muestreo adaptativo. Cada enfoque presentó ventajas y limitaciones, proporcionando información valiosa para el desarrollo futuro de protocolos de diagnóstico molecular para AH.

5.2.1. Estrategia 1: Captura mediante el sistema CRISPR/cas9 o CRISPR/dcas9

La tecnología CRISPR-Cas9, combinada con plataformas de secuenciación como ONT, emergió como una estrategia prometedora para el enriquecimiento y análisis de regiones genómicas complejas. La capacidad de CRISPR-Cas para dirigirse específicamente a secuencias de interés permite, en teoría, un enriquecimiento preciso de las regiones de importancia para el diagnóstico de AH sin necesidad de amplificación previa. Esta característica es particularmente valiosa en el estudio de expansiones de TR, donde los métodos de amplificación tradicionales pueden introducir sesgos

o fallar en la representación adecuada de alelos altamente expandidos. Sin embargo, la aplicación práctica de esta técnica enfrenta desafíos significativos. Las limitaciones principales incluyen la necesidad de un conocimiento detallado de secuencias flanqueantes, la dependencia de sitios PAM específicos, y el riesgo de efectos off-target debido a la naturaleza repetitiva de las regiones de interés (16,38,117). Además, la cantidad sustancial de ADN requerida para el protocolo sin amplificación resultó en nuestro caso ser una limitación práctica importante.

En un intento por superar estas limitaciones, se exploró una estrategia de captura alternativa que requiriera menos ADN de partida. Los resultados iniciales de esta estrategia, aunque prometedores, no pudieron completarse con éxito debido a la incompatibilidad del producto de amplificación de RCA para el armado de librerías de ONT. Esta experiencia subraya la necesidad de continuar innovando en las metodologías de preparación de muestras para ser secuenciadas mediante ONT, con el objetivo de desarrollar protocolos que sean no solo precisos e informativos, sino también prácticos y accesibles en el entorno clínico.

5.2.2. Estrategia 2: Secuenciación de un panel de genes generado por PCR mediante Oxford Nanopore Technologies

La aproximación mediante panel de genes proporcionó resultados que demostraron el potencial de ONT para caracterizar regiones repetitivas en diversos genes asociados a AH. Un hallazgo particularmente interesante fue la identificación de una posible secuencia interruptora CAA en una familia con SCA3, que podría explicar la variabilidad fenotípica observada.

Este descubrimiento es especialmente notable a la luz de estudios previos que han asociado interrupciones CAA con diferencias en la edad de inicio y presentación clínica en otras enfermedades de expansión, como la EH (118) o la asociación a cuadros de parkinsonismo en pacientes con SCA2(17,107,119). La presencia de estas interrupciones podría tener implicaciones significativas en la patogénesis y la expresión clínica de SCA3, abriendo nuevas vías de investigación sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la variabilidad fenotípica en las AH.

Otro caso destacable fue el del paciente previamente diagnosticado con SCA48. La identificación de un alelo intermedio en el gen TBP, en el contexto de una variante en STUB1, subraya la complejidad de estas enfermedades y la necesidad de considerar interacciones génicas en la interpretación de los resultados. Este hallazgo resalta la importancia de un enfoque diagnóstico integral y la necesidad de reevaluar continuamente los diagnósticos a la luz de nuevos descubrimientos (82–84,120).

En esta aproximación, se destaca la capacidad de poder realizar la construcción de librerías y secuenciación en un día de trabajo, pero marca el requerimiento de amplificación por PCR y el análisis bioinformático manual representan limitaciones significativas para la aplicación rutinaria de

este enfoque. Estas limitaciones subrayan la necesidad de desarrollar protocolos y herramientas bioinformáticas más automatizados para el análisis de datos de secuenciación de LRS.

5.2.3. Estrategia 3: Aplicación del muestreo adaptativo con Oxford Nanopore Technologies para el diagnóstico molecular de un paciente con ataxia episódica tipo 2

El muestreo adaptativo emergió como la estrategia más prometedora entre las evaluadas. Esta técnica demostró una notable eficiencia en la captura de regiones genómicas de interés, logrando una mayor concentración de lecturas en las regiones objetivo y una disminución en la cobertura de regiones adyacentes. La capacidad de realizar un análisis integral, identificando simultáneamente variantes puntuales patogénicas (como se demostró en el caso del paciente con AE2) y caracterizando expansiones de TR en múltiples loci, representa un avance significativo en el diagnóstico molecular de AH. Esta capacidad de análisis integral en un tiempo relativamente corto podría revolucionar el enfoque diagnóstico de las AH, potencialmente reduciendo la "odisea diagnóstica" que muchos pacientes con trastornos neurogenéticos experimentan.

Aunque la profundidad de cobertura fue menor en comparación con NGS, resultó suficiente para la detección y caracterización de variantes relevantes. Estudios previos han demostrado que, aunque la profundidad es crucial para detectar variantes de baja frecuencia, en el caso de la caracterización de secuencias repetitivas, se requiere una profundidad mínima de 10-15× para obtener una buena lectura de ambos alelos con la tecnología de muestreo adaptativo (115). Este umbral se alcanzó y superó en el paciente estudiado en varias de las regiones de interés, validando la eficiencia de la estrategia empleada.

5.2.4. Ventajas y limitaciones de ONT en el diagnóstico molecular

Las principales ventajas del enfoque basado en ONT incluyen la simplificación del proceso de preparación de muestras, la capacidad de análisis integral de diferentes tipos de variantes genéticas, la flexibilidad para diversos trastornos genéticos, y la portabilidad del equipo. La facilidad y rapidez de preparación de muestras con ONT, comparado con otros métodos más complejos, podría acelerar significativamente el proceso diagnóstico. Además, la adaptabilidad de ONT para ser utilizado en diferentes contextos clínicos y de investigación, junto con la portabilidad del equipo, ofrece la posibilidad de realizar diagnósticos en tiempo real incluso en ubicaciones remotas, democratizando el acceso a diagnósticos genéticos avanzados.

Sin embargo, se identificaron ciertas limitaciones que deben abordarse en futuras investigaciones. La principal es la menor profundidad de cobertura en comparación con NGS, lo cual podría afectar la detección de variantes de baja frecuencia o requerir un método de detección complementario. Otra limitación es la obtención de ADN de alto peso molecular a buena concentración, lo cual implicaría la mejora de los métodos de extracción de ADN utilizados

convencionalmente en la práctica clínica. En cuanto al costo, aunque el muestreo adaptativo es práctico, al utilizar una celda de flujo completa por paciente, implica un costo mínimo de 700 USD, lo cual sigue siendo costoso en comparación con los enfoques convencionales. No obstante, al igual que ocurrió con NGS, es probable que el costo disminuya con el tiempo, expandiendo así su implementación en centros de salud e investigación.

5.2.5. Perspectivas futuras

La capacidad de ONT para proporcionar una caracterización más completa de las regiones genómicas complejas podría mejorar significativamente la precisión diagnóstica, permitiendo una mejor correlación genotipo-fenotipo y, por ende, un manejo clínico más personalizado en el campo de las AH y otros trastornos neurogenéticos.

En el ámbito de la investigación, la capacidad de ONT para detectar y caracterizar interrupciones en las expansiones de TR abre nuevos caminos para el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la variabilidad fenotípica de las AH. Esto podría conducir a una comprensión más profunda de la patogénesis de estas enfermedades y, potencialmente, al desarrollo de terapias dirigidas.

Sin embargo, para que estas tecnologías puedan ser aplicadas en la práctica clínica, se debe trabajar en los siguientes aspectos:

1. Optimización de protocolos para alcanzar mejoras en la profundidad de cobertura.
2. Estudios a mayor escala para validar estos métodos en un contexto clínico más extenso, incluyendo una gama más amplia de trastornos neurogenéticos.
3. Mejora o desarrollo de herramientas bioinformáticas con énfasis en la detección y caracterización precisa de expansiones de TR y sus interrupciones.
4. Estudios funcionales que profundicen en el impacto biológico de las interrupciones en las expansiones de TR para mejorar la comprensión de la variabilidad fenotípica en las AH.
5. Reducción de costos por paciente.

En resumen, el trabajo exploratorio llevado a cabo durante la tesis demuestra que la secuenciación ONT, especialmente con muestreo adaptativo, ofrece una herramienta prometedora para el diagnóstico molecular y la comprensión de la variabilidad fenotípica en trastornos neurogenéticos. Aunque aún existen desafíos por superar, estas tecnologías ofrecen una nueva perspectiva para el estudio de regiones genómicas complejas, prometiendo avances significativos en la comprensión y diagnóstico de trastornos genéticos hasta ahora difíciles de caracterizar.

La implementación de estas tecnologías en la práctica clínica podría transformar el panorama del diagnóstico molecular de las AH, ofreciendo a los pacientes diagnósticos más rápidos, precisos y completos, y abriendo nuevas vías para la medicina personalizada en el campo de los trastornos neurogenéticos. A medida que estas tecnologías continúen evolucionando, es probable que se observe un cambio paradigmático en nuestra capacidad para comprender, diagnosticar y, en última instancia, tratar estas complejas enfermedades genéticas.

6. CONCLUSIONES

Esta tesis doctoral ha abordado el desafiante campo de las AH, un grupo heterogéneo de trastornos neurológicos caracterizados por la pérdida progresiva de la coordinación motora. A lo largo de este trabajo, se ha buscado contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de las AH, con un enfoque particular en la identificación de mutaciones etiopatogénicas y factores genéticos modificadores en una cohorte de pacientes argentinos afectados por estos trastornos. Para lograr este objetivo, se ha empleado una combinación sinérgica de técnicas avanzadas de secuenciación genómica y análisis bioinformáticos, aprovechando los recursos de un centro de salud e investigación biomédica enfocado en el desarrollo de la genómica y la bioinformática traslacional en Argentina.

El primer objetivo específico de este trabajo se centró en realizar un análisis sistemático para evaluar exhaustivamente la estrategia de diagnóstico genético-molecular integral desarrollada e implementada por el grupo de Neurogenética de la División de Neurología del Hospital JM Ramos Mejía. Este enfoque ha permitido no solo caracterizar clínica y genéticamente a la población de estudio, sino también establecer algoritmos diagnósticos que mejoran la precisión diagnóstica y permiten un uso más racional de los recursos disponibles.

La serie de 334 pacientes presentada en este estudio representa la cohorte más extensa de AH reportada hasta la fecha en Argentina. Este análisis ha proporcionado información epidemiológica valiosa, ofreciendo un conocimiento más preciso de los subtipos más prevalentes de ataxias en nuestra región y de sus principales características fenotípicas. El rédito diagnóstico global alcanzado fue del 33.8%, llegando hasta un 55% en el subgrupo de pacientes con historia familiar positiva. Estos resultados son comparables con los obtenidos en series similares a nivel internacional, lo que valida la efectividad de nuestro enfoque diagnóstico.

En cuanto a la distribución de los subtipos de AH, se encontró que SCA2 fue la forma dominante más frecuente en nuestra cohorte, seguida por SCA3 y SCA1. Esta distribución difiere ligeramente de la observada a nivel global, donde SCA3 suele ser la más prevalente. Esta variación podría atribuirse a las particularidades genéticas de la población argentina, influenciada por las corrientes migratorias históricas. Por otro lado, en las formas recesivas, la AF fue claramente predominante, representando el 62% de los casos diagnosticados en este grupo.

Un hallazgo destacado de este estudio fue la extensa "odisea diagnóstica" experimentada por los pacientes, con una demora promedio de 11 años desde el inicio de los síntomas hasta la confirmación molecular. Este dato subraya la importancia de implementar estrategias diagnósticas más eficientes y accesibles para reducir este tiempo y mejorar el manejo clínico de los pacientes.

La caracterización fenotípica detallada de los pacientes ha permitido identificar ciertas características clínicas que pueden orientar hacia subtipos específicos de AH. Por ejemplo, la

presencia de movimientos sacádicos horizontales marcadamente lentos resultó ser un hallazgo frecuente en pacientes con SCA2, mientras que la coexistencia de parkinsonismo y polineuropatía fue común en SCA3. Estos datos pueden ser de gran utilidad para guiar el diagnóstico clínico inicial y priorizar los estudios genéticos.

El desarrollo y validación de paneles multigénicos para el diagnóstico genético-molecular de las ataxias mediante el uso de tecnologías de secuenciación masiva en paralelo NGS ha sido otro logro significativo de este trabajo. La implementación de estas técnicas ha demostrado ser particularmente útil en pacientes con fenotipos no característicos o complejos, o cuando se han descartado previamente los subtipos más frecuentes de AH. El alto rendimiento diagnóstico obtenido con estas tecnologías (17 diagnósticos en 26 pacientes estudiados) resalta su potencial para mejorar la precisión diagnóstica y reducir los tiempos y costos asociados al proceso diagnóstico.

Es importante resaltar que todas las variantes genéticas con relevancia diagnóstica identificadas mediante NGS se encontraron en los genes incluidos en el panel multigénico virtual diseñado para el filtrado e interpretación de variantes (**Anexo 3**). Este hallazgo subraya la eficacia y pertinencia del desarrollo y validación de paneles multigénicos para el diagnóstico genético-molecular de AH, lo cual constituyó uno de los objetivos de esta tesis.

Los casos ilustrativos presentados en este trabajo ponen de manifiesto la complejidad y heterogeneidad de las AH, así como la importancia de un enfoque diagnóstico integral que combine la evaluación clínica exhaustiva con las técnicas moleculares avanzadas. Estos casos demuestran cómo la persistencia en la sospecha clínica, el uso apropiado de las herramientas de diagnóstico molecular y la interpretación cuidadosa de los resultados pueden conducir a diagnósticos precisos incluso en situaciones clínicamente desafiantes.

El segundo objetivo específico de esta tesis se centró en explorar el uso de la secuenciación de tercera generación para el diagnóstico y la caracterización molecular de las regiones etiopatogénicas del genoma en las ataxias causadas por expansiones de repeticiones en tándem (TR). Este enfoque innovador busca superar las limitaciones de las técnicas convencionales en el análisis de estas regiones complejas del genoma.

Se evaluaron tres estrategias diferentes para la captura y secuenciación de regiones repetitivas: la captura mediante el sistema CRISPR-Cas, la construcción de un panel de genes asociados a TR mediante PCR, y la construcción de un panel de genes asociados a TR mediante muestreo adaptativo. Cada una de estas aproximaciones presentó sus propios desafíos y oportunidades.

La estrategia basada en CRISPR-Cas9, aunque prometedora en su concepto, enfrentó limitaciones técnicas significativas. Si bien se logró un enriquecimiento preliminar de las regiones de

interés, los desafíos en la construcción de librerías y la secuenciación de regiones repetitivas complejas impidieron la obtención de resultados concluyentes. Esto subraya la complejidad inherente al análisis de las expansiones de TR y la necesidad de continuar refinando estas técnicas.

La estrategia de construcción de un panel de genes asociados a TR mediante PCR, seguida de secuenciación con tecnología ONT, demostró ser más factible y prometedora. Este enfoque permitió la captura y secuenciación simultánea de múltiples regiones asociadas a AH, ofreciendo una visión más completa del panorama genético de estos trastornos. La capacidad de generar lecturas largas con ONT facilitó la caracterización de las expansiones de TR, superando algunas de las limitaciones de las técnicas de secuenciación de segunda generación.

Sin embargo, la estrategia que mostró resultados más prometedores fue la basada en el muestreo adaptativo o "adaptive sampling" con ONT. Esta aproximación, que utiliza un panel virtual y personalizado para dirigir la secuenciación hacia regiones específicas del genoma, demostró ser altamente efectiva para capturar las regiones genómicas de interés. La capacidad de analizar simultáneamente diferentes tipos de variantes genéticas (expansiones de TR, SNVs, InDels) en una sola corrida de secuenciación ofrece una perspectiva integral para el diagnóstico molecular y la comprensión de la etiología genética de las AH.

Los resultados obtenidos con el muestreo adaptativo en un paciente con Ataxia Episódica tipo 2 (AE2) fueron particularmente alentadores. Se logró identificar la variante patogénica previamente asociada con AE2 y, al mismo tiempo, genotipificar los genes asociados con las expansiones de TR en AH. Esta capacidad de análisis simultáneo y comprehensivo representa un avance significativo en el diagnóstico molecular de estos trastornos complejos.

Es importante destacar que, si bien la profundidad de cobertura obtenida con ONT fue inferior a la alcanzada con métodos de NGS convencionales, las regiones de interés pudieron ser identificadas y analizadas de manera efectiva. Esto subraya el potencial de esta tecnología para proporcionar información valiosa incluso con una cobertura relativamente baja, lo que podría traducirse en menores costos y tiempos de procesamiento.

La implementación de estas tecnologías de secuenciación de tercera generación en el estudio de las AH abre nuevas posibilidades para la investigación y el diagnóstico clínico. La capacidad de caracterizar con mayor precisión las expansiones de TR, junto con la posibilidad de detectar otros tipos de variantes genéticas en una sola corrida, podría revolucionar nuestra comprensión de la base genética de estos trastornos y mejorar significativamente la precisión diagnóstica.

Además, la portabilidad y facilidad de uso de dispositivos como el MinION de ONT ofrecen la posibilidad de llevar estas tecnologías avanzadas a entornos clínicos más diversos, potencialmente reduciendo las barreras de acceso a diagnósticos genéticos avanzados. Esto podría ser

particularmente beneficioso en regiones con recursos limitados o en situaciones que requieren resultados rápidos.

Sin embargo, es importante reconocer que estas tecnologías aún enfrentan desafíos. La interpretación de los datos generados por la secuenciación de lecturas largas requiere de herramientas bioinformáticas especializadas y de personal capacitado para su análisis. Además, la validación clínica de estos métodos aún está en proceso, lo que limita su aplicación inmediata en el diagnóstico de rutina.

En conjunto, los resultados de esta tesis doctoral contribuyen significativamente al campo de las AH en varios aspectos:

1. Caracterización epidemiológica: Este estudio proporciona datos relevantes sobre la prevalencia y distribución de los diferentes subtipos de AH en la población argentina, información que hasta ahora era limitada. Estos datos son cruciales para la planificación de servicios de salud y para guiar futuras investigaciones en la región.

2. Mejora de los algoritmos diagnósticos: Los algoritmos desarrollados y validados en este trabajo ofrecen una guía práctica para el abordaje diagnóstico de las AH, permitiendo un uso más eficiente de los recursos y potencialmente reduciendo el tiempo hasta el diagnóstico.

3. Validación de paneles multigénicos: La demostración de la utilidad de los paneles multigénicos en el diagnóstico de AH proporciona una herramienta valiosa para la práctica clínica, especialmente en casos complejos o atípicos.

4. Exploración de nuevas tecnologías: La evaluación de las tecnologías de secuenciación de tercera generación para el estudio de las AH abre nuevas posibilidades para la investigación y el diagnóstico, especialmente en el desafiante campo de las expansiones de TR.

5. Identificación de nuevas variantes: El descubrimiento de variantes genéticas no reportadas previamente contribuye a expandir nuestro conocimiento sobre la base genética de las AH y puede llevar a una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos subyacentes.

6. Correlaciones genotipo-fenotipo: La caracterización detallada de los fenotipos asociados a diferentes variantes genéticas proporciona información valiosa para el pronóstico y el manejo clínico de los pacientes.

A pesar de estos avances significativos, es importante reconocer las limitaciones de este estudio. La cohorte, aunque es la más grande reportada en Argentina, sigue siendo relativamente pequeña en comparación con estudios internacionales más amplios. Además, la naturaleza retrospectiva de parte del análisis puede haber introducido sesgos en la recolección de datos. Por

otro lado, las nuevas tecnologías de secuenciación exploradas, aunque prometedoras, aún requieren de mayor validación y optimización antes de su implementación rutinaria en la práctica clínica.

Mirando hacia el futuro, este trabajo sienta las bases para varias líneas de investigación prometedoras:

1. Estudios funcionales de nuevas variantes: Las variantes genéticas no reportadas previamente identificadas en este estudio merecen una caracterización funcional más profunda para comprender su impacto en la patogénesis de las AH.

2. Optimización de las tecnologías de secuenciación de tercera generación: Se necesita más trabajo para mejorar la captura y secuenciación de regiones repetitivas, así como para desarrollar herramientas bioinformáticas más robustas para el análisis de estos datos.

3. Estudios de factores modificadores: La identificación de factores genéticos que puedan modificar la expresión clínica de las AH podría llevar a una mejor comprensión de la variabilidad fenotípica observada en estos trastornos.

4. Desarrollo de terapias dirigidas: El conocimiento más preciso de las bases genéticas de las AH podría abrir caminos para el desarrollo de terapias dirigidas, incluyendo aproximaciones de terapia génica o de ARN.

5. Estudios epidemiológicos más amplios: Sería recomendable extender este tipo de estudio a otras regiones de Argentina y Latinoamérica para obtener una imagen más completa de la epidemiología de las AH en la región.

En conclusión, esta tesis doctoral representa un avance significativo en nuestra comprensión de las AH en la población argentina. A través de un enfoque integral que combina la caracterización clínica detallada, el análisis genético molecular avanzado y la exploración de nuevas tecnologías de secuenciación, este trabajo ha proporcionado información valiosa sobre la epidemiología, las correlaciones genotipo-fenotipo y las estrategias diagnósticas para estos trastornos complejos. Los algoritmos y herramientas desarrollados tienen el potencial de mejorar significativamente el diagnóstico y manejo de pacientes con AH, no solo en Argentina sino potencialmente en toda la región latinoamericana.

Además, la exploración de tecnologías de secuenciación de tercera generación abre nuevas posibilidades para el estudio de las expansiones de TR, un aspecto crucial en la genética de las AH que ha sido históricamente desafiante. Aunque estas tecnologías aún requieren refinamiento y validación adicional, su potencial para proporcionar una visión más completa y precisa del panorama genético de las AH es innegable.

Este trabajo no solo contribuye al conocimiento científico, sino que también tiene implicaciones prácticas importantes para el cuidado de los pacientes. La mejora en la precisión diagnóstica, la reducción potencial en los tiempos de diagnóstico y la posibilidad de ofrecer asesoramiento genético más preciso son beneficios tangibles que pueden mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes y sus familias.

Finalmente, este estudio sienta las bases para futuras investigaciones en el campo de las AH y otras enfermedades neurogenéticas. Los desafíos identificados y las preguntas que surgen de este trabajo proporcionan un punto de partida valioso para continuar avanzando en nuestra comprensión de estos trastornos complejos, con la esperanza última de desarrollar terapias más efectivas y, eventualmente, encontrar curas para estas condiciones devastadoras.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Pilotto F, Bondio A Del, Puccio H. Hereditary Ataxias: From Bench to Clinic, where Do We Stand? Cells. 2024 Feb;13(4):319.
2. Pilotto F, Saxena S. Epidemiology of inherited cerebellar ataxias and challenges in clinical research. Clinical and Translational Neuroscience. 2018 Jul;2(2):22.
3. Ashizawa T, Xia G. Ataxia. 2016;22(4 Movement Disorders):1208–26.
4. Kuo SH. Ataxia. Vol. 25, CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 1036–54.
5. Tanburoğlu A, Karataş M. Ataxias: Pathogenesis, Types, Causes and Treatment. Derleme/Review Medical Journal of Mugla Sitki Kocman University. 2017;4(2):32–9.
6. Lin CYR, Kuo SH. Ataxias: Hereditary, Acquired, and Reversible Etiologies. Semin Neurol. 2023 Apr 3;43(1):48–64.
7. Klockgether T, Paulson H. Milestones in Ataxia. Movement Disorders. 2011 May;26(6):1134–41.
8. Jayadev S, Bird TD. Hereditary ataxias: Overview. Genetics in Medicine. 2013 Sep;15(9):673–83.
9. Diagnosis of cerebellar disorders as a function of age. Cerebellar Disorders. 2010 Aug 3;69–74.
10. Berciano J, García A, Infante J. Chapter 51 - Peripheral nerve involvement in hereditary cerebellar and multisystem degenerative disorders. In: Said G, Krarup C, editors. Handbook of Clinical Neurology. Elsevier; 2013. p. 907–32.
11. Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. Essays Biochem. 2018 Dec 3;62(5):643–723.
12. Arias M, García-Murias M, Sobrido MJ. La ataxia espinocerebelosa 36 (SCA36): «Ataxia da Costa da Morte». Neurología. 2017;32(6):386–93.
13. Sandford E, Burmeister M. Genes and genetic testing in hereditary ataxias. Genes (Basel). 2014;5(3):586–603.
14. Gottesfeld JM. Molecular Mechanisms and Therapeutics for the GAA·TTC Expansion Disease Friedreich Ataxia. Neurotherapeutics. 2019 Oct 1;16(4):1032–49.

15. Kurosaki T, Ashizawa T. The genetic and molecular features of the intronic pentanucleotide repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 10. Front Genet. 2022 Sep 15;13.

16. Depienne C, Mandel JL. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? Am J Hum Genet. 2021 May;108(5):764–85.

17. Choudhry S, Mukerji M, Srivastava AK, Jain S, Brahmachari SK. CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. Hum Mol Genet. 2001 Oct;10(21):2437–46.

18. McFarland KN, Liu J, Landrian I, Zeng D, Raskin S, Moscovich M, et al. Repeat interruptions in spinocerebellar ataxia type 10 expansions are strongly associated with epileptic seizures. Neurogenetics. 2014 Mar;15(1):59–64.

19. Ghorbani F, De Boer EN, Benjamins-Stok M, Verschuuren-Bemelmans CC, Knapper J, De Boer-Bergsma J, et al. Copy Number Variant Analysis of Spinocerebellar Ataxia Genes in a Cohort of Dutch Patients with Cerebellar Ataxia. Neurol Genet. 2023 Feb 2;9(1).

20. De Silva RN, Vallortigara J, Greenfield J, Hunt B, Giunti P, Hadjivassiliou M. Diagnosis and management of progressive ataxia in adults. Pract Neurol. 2019 Jun 1;19(3):196–207.

21. Palau F, Espinós C. Approach to the differential diagnosis of cerebellar Ataxias. Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders. 2013 Jan 1;1799–818.

22. Schmitz-Hü T, Tezenas Du Montcel ; S, Baliko ; L, Berciano ; J, Boesch ; S, Depondt ; C, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia Development of a new clinical scale. Vol. 66, NEUROLOGY. 2006.

23. Brusse E, Maat-Kievit JA, van Swieten JC. Diagnosis and management of early- and late-onset cerebellar ataxia. Clin Genet. 2007 Jan;71(1):12–24.

24. Life technologies. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. 2014.

25. Cagnoli C, Michielotto C, Matsuura T, Ashizawa T, Margolis RL, Holmes SE, et al. Detection of Large Pathogenic Expansions in FRDA1, SCA10, and SCA12 Genes Using a Simple Fluorescent Repeat-Primed PCR Assay. J Mol Diagn. 2004 May;6:96–100.

26. Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, et al. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. JMed Genet. 1996 Dec;33(2):1022–6.

27. Gorcenco S, Ilinca A, Almasoudi W, Kafantari E, Lindgren AG, Puschmann A. New generation genetic testing entering the clinic. Parkinsonism Relat Disord. 2020 Apr 1;73:72–84.

28. Galatolo D, Tessa A, Filla A, Santorelli FM. Clinical application of next generation sequencing in hereditary spinocerebellar ataxia: increasing the diagnostic yield and broadening the ataxia-spasticity spectrum. A retrospective analysis. Neurogenetics. 2018 Jan 1;19(1).

29. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. Nat Rev Genet. 2020 Oct 1;21(10):597–614.

30. Vestergaard LK, Oliveira DNP, Høgdall CK, Høgdall E V. Next Generation Sequencing Technology in the Clinic and Its Challenges. Cancers (Basel). 2021 Apr 2;13(8).

31. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetics in Medicine. 2013 Sep 1;15(9):733–47.

32. Tenorio RB, Camargo CHF, Donis KC, Almeida CCB, Teive HAG. Diagnostic Yield of NGS Tests for Hereditary Ataxia: a Systematic Review. Cerebellum. 2023 Nov;

33. Xiao T, Zhou W. The third generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. Transl Pediatr. 2020 Apr 1;9(2):163.

34. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2015 Oct;13(5):278–89.

35. Oehler JB, Wright H, Stark Z, Mallett AJ, Schmitz U. The application of long-read sequencing in clinical settings. Hum Genomics. 2023 Dec 1;17(1).

36. Loose M, Malla S, Stout M. Real-time selective sequencing using nanopore technology. Nature Methods 2016 13:9. 2016 Jul 25;13(9):751–4.

37. Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, et al. Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. Nat Genet. 2018 Apr 1;50(4):581–90.

38. Malekshoar M, Azimi SA, Kaki A, Mousazadeh L, Motaei J, Vatankhah M. CRISPR-Cas9 Targeted Enrichment and Next-Generation Sequencing for Mutation Detection. The Journal of Molecular Diagnostics. 2023 May;25:249–62.

39. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Doi H, Okubo M, Wada T, et al. Rapid and comprehensive diagnostic method for repeat expansion diseases using nanopore sequencing. NPJ Genom Med. 2022 Oct;7(1):62.

40. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May 8;17(5):405.

41. Rodríguez-Quiroga SA, Cordoba M, González-Morón D, Medina N, Vega P, Dusefante CV, et al. Neurogenetics in Argentina: diagnostic yield in a personalized research based clinic. Genet Res (Camb). 2015 May;97:e10.

42. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: A systematic review of prevalence studies. Neuroepidemiology. 2014 Mar;42(3):174–83.

43. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. 2009 Jul;25(14):1754–60.

44. Van Der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. Curr Protoc Bioinformatics. 2013;11(1110):11.10.1-11.10.33.

45. Córdoba M, Alejandro Rodriguez-Quiroga S, Vega PA, Salinas V, Perez-Maturo J, Amartino H, et al. Whole exome sequencing in neurogenetic odysseys: An effective, cost- and time-saving diagnostic approach. PLoS One. 2018 Feb;13(2):e0191228.

46. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics. 2018 Sep 15;34(18):3094–100.

47. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res. 1999 Jan 15;27(2):573–80.

48. Zheng Z, Li S, Su J, Leung AWS, Lam TW, Luo R. Symphonizing pileup and full-alignment for deep learning-based long-read variant calling. Nature Computational Science 2022 2:12. 2022 Dec 19;2(12):797–803.

49. Smolka M, Paulin LF, Grochowski CM, Horner DW, Mahmoud M, Behera S, et al. Detection of mosaic and population-level structural variants with Sniffles2. Nature Biotechnology 2024. 2024 Jan 2;1–10.

50. Chiu R, Rajan-Babu IS, Friedman JM, Birol I. Straglr: discovering and genotyping tandem repeat expansions using whole genome long-read sequences. Genome Biol. 2021 Dec 1;22(1):1–20.

51. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. Nucleic Acids Res. 2014 Jan 1;42(Database issue):D980.

52. Orr HT, Chung M yi, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Servadio A, Beaudet AL, et al. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nat Genet. 1993 Jul;4(3):221–6.

53. Lorenzetti D, Bohlega S, Zoghbi HY. The expansion of the CAG repeat in ataxin-2 is a frequent cause of autosomal dominant spinocerebellar ataxia. Neurology. 1997;49(4):1009–13.

54. 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. Nat Genet. 1994 Nov;8(3):221–8.

55. Riess O, Schöls L, Böttger H, Nolte D, Menezes Vieira-Saecker AM, Schimming C, et al. SCA6 is caused by moderate CAG expansion in the alpha1A-voltage-dependent calcium channel gene. Hum Mol Genet. 1997 Aug;6(8):1289–93.

56. David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. Nat Genet. 1997 Sep;17(1):65–70.

57. MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell. 1993 Mar 26;72(6):971–83.

58. Mallucci GR, Campbell TA, Dickinson A, Beck J, Holt M, Plant G, et al. Inherited prion disease with an alanine to valine mutation at codon 117 in the prion protein gene. Brain. 1999 Oct;122 (Pt 10)(10):1823–37.

59. Liao Y, Anttonen AK, Liukkonen E, Gaily E, Maljevic S, Schubert S, et al. SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. Neurology. 2010 Oct 19;75(16):1454–8.

60. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. Am J Hum Genet. 2011 Jul 15;89(1):121–30.

61. Syrbe S, Hedrich UBS, Riesch E, Djémié T, Müller S, Møller RS, et al. De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. Nat Genet. 2015 Apr 28;47(4):393–9.

62. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, et al. Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. Science (1979). 1996 Mar 8;271(5254):1423–7.

63. Gellera C, Castellotti B, Mariotti C, Mineri R, Seveso V, DiDonato S, et al. Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. Neurogenetics. 2007 Nov 17;8(4):289–99.

64. Sun X, Marks DL, Park WD, Wheatley CL, Puri V, O'Brien JF, et al. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. Am J Hum Genet. 2001 Jun;68(6):1361–72.

65. Greer WL, Riddell DC, Murty S, Gillan TL, Girouard GS, Sparrow SM, et al. Linkage disequilibrium mapping of the Nova Scotia variant of Niemann–Pick disease. Clin Genet. 1999 Apr 1;55(4):248–55.

66. Ribeiro I, Marcão A, Amaral O, Sá Miranda MC, Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. Hum Genet. 2001 Jul;109(1):24–32.

67. Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, et al. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. Nat Genet. 2001 Oct;29(2):189–93.

68. Verrips A, Hoefsloot LH, Steenbergen GCH, Theelen JP, Wevers RA, Gabreëls FJM, et al. Clinical and molecular genetic characteristics of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Brain. 2000 May;123 (Pt 5)(5):908–19.

69. Dibbens LM, Michelucci R, Gambardella A, Andermann F, Rubboli G, Bayly MA, et al. SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure. Ann Neurol. 2009 Oct;66(4):532–6.

70. Toomes C, Marchbank NJ, Mackey DA, Craig JE, Newbury-Ecob RA, Bennett CP, et al. Spectrum, frequency and penetrance of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. Hum Mol Genet. 2001 Jun 15;10(13):1369–78.

71. Mougou-Zerelli S, Thomas S, Szenker E, Audollent S, Elkhartoufi N, Babarit C, et al. CC2D2A mutations in Meckel and Joubert syndromes indicate a genotype-phenotype correlation. Hum Mutat. 2009 Nov;30(11):1574–82.

72. Bachmann-Gagescu R, Dempsey JC, Phelps IG, O'Roak BJ, Knutzen DM, Rue TC, et al. Joubert syndrome: A model for untangling recessive disorders with extreme genetic heterogeneity. J Med Genet. 2015;52(8):514.

73. Kohan R, Carabelos MN, Xin W, Sims K, Guelbert N, Cismondi IA, et al. Neuronal ceroid lipofuscinosis type CLN2: A new rationale for the construction of phenotypic subgroups based on a survey of 25 cases in South America. Gene. 2013 Mar 3;516(1):114–21.

74. Bessa C, Teixeira CA, Dias A, Alves M, Rocha S, Lacerda L, et al. CLN2/TPP1 deficiency: the novel mutation IVS7-10A>G causes intron retention and is associated with a mild disease phenotype. Mol Genet Metab. 2008 Jan;93(1):66–73.

75. Cagnoli C, Stevanin G, Brussino A, Barberis M, Mancini C, Margolis RL, et al. Missense mutations in the AFG3L2 proteolytic domain account for ~1.5% of European autosomal dominant cerebellar ataxias. Hum Mutat. 2010 Oct 1;31(10):1117–24.

76. Sun Y, Almomani R, Breedveld GJ, Santen GWE, Aten E, Lefeber DJ, et al. Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia 7 (SCAR7) is Caused by Variants in TPP1, The Gene Involved in Classic Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 2 Disease (CLN2 Disease). Hum Mutat. 2013 May 1;34(5):706–13.

77. Breedveld GJ, Van Wetten B, Te Raa GD, Brusse E, Van Swieten JC, Oostra BA, et al. A new locus for a childhood onset, slowly progressive autosomal recessive spinocerebellar ataxia maps to chromosome 11p15. J Med Genet. 2004 Nov 1;41(11):858–66.

78. Ma L, Prada AM, Schmidt M, Morrow EM. Generation of pathogenic TPP1 mutations in human stem cells as a model for neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 disease. Stem Cell Res. 2021 May 1;53.

79. Dy ME, Sims KB, Friedman J. TPP1 deficiency: Rare cause of isolated childhood-onset progressive ataxia. Neurology. 2015 Oct 6;85(14):1259–61.

80. Biomarin Pharmaceutical (Canada) Inc. Clinical Review Report: Cerliponase Alfa (Brineura). 2019;

81. Rodríguez-Quiroga S, Perez Maturo J, Zavala L, Kauffman MA. Novel dominant variant in STUB1 causing ataxia, movement disorders and cognitive impairment: A complex phenotype mimicking SCA17. Neurología Argentina. 2022;14(3):183–6.

82. Barbier M, Davoine CS, Petit E, Porché M, Guillot-Noel L, Sayah S, et al. Intermediate repeat expansions of TBP and STUB1: Genetic modifier or pure digenic inheritance in spinocerebellar ataxias? Genetics in Medicine. 2023 Feb 1;25(2):100327.

83. Magri S, Nanetti L, Gellera C, Sarto E, Rizzo E, Mongelli A, et al. Digenic inheritance of STUB1 variants and TBP polyglutamine expansions explains the incomplete penetrance of SCA17 and SCA48. Genetics in Medicine. 2022 Jan 1;24(1):29–40.

84. Nanetti L, Magri S, Fichera M, Castaldo A, Nigri A, Pinardi C, et al. Complex Ataxia-Dementia Phenotype in Patients with Digenic TBP/STUB1 Spinocerebellar Ataxia. Movement Disorders. 2023 Apr 1;38(4):665–75.

85. Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna K V, Mcdonald MT, et al. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. J Med Genet. 2012 Jun;49(6):353–61.

86. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders. JAMA. 2014 Nov 12;312(18):1880–7.

87. Shashi V, Schoch K, Spillmann R, Cope H, K-G Tan Q, Walley N, et al. A comprehensive iterative approach is highly effective in diagnosing individuals who are exome negative. Genetics in Medicine. 2019 Jan;21:161–72.

88. 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 May 1;61(5):727–33.

89. Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, Bird TD, Gomez CM, Barkhaus PE, et al. Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. Neurology. 1998 Dec;51(6):1666–71.

90. Venkatesh SD, Kandasamy M, Moily NS, Vaidyanathan R, Kota LN, Adhikarla S, et al. Genetic testing for clinically suspected spinocerebellar ataxias: report from a tertiary referral centre in India. J Genet. 2018 Mar;97(1):219–24.

91. Albertson R, Paulson H, Srinivasan S, Shakkottai V, Todd P. Diagnostic Yield of Genetic Testing Over Five Years in a Tertiary Ataxia Clinic (P7-3.017). Neurology. 2024 Apr 9;102(17_supplement_1).

92. Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: Polyglutamine expansions and beyond. Lancet Neurol. 2010 Sep 1;9(9):885–94.

93. De Mattei F, Ferrandes F, Gallone · Salvatore, Canosa · Antonio, Calvo A, Chiò A, et al. Epidemiology of Spinocerebellar Ataxias in Europe. The Cerebellum. 2024 Jun;23(3):1176–83.

94. van Prooije T, Ibrahim NM, Azmin S, van de Warrenburg B. Spinocerebellar ataxias in Asia: Prevalence, phenotypes and management. Parkinsonism Relat Disord. 2021 Nov;92:112–8.

95. Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, Do Céu Moreira M, et al. A survey of spinocerebellar ataxia South Brazil - 66 New cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. J Neurol. 2001 Oct;248(10):870–6.

96. Ortega Suero G, Abenza Abildúa MJ, Serrano Munuera C, Rouco Axpe I, Arpa Gutiérrez FJ, Adarmes Gómez AD, et al. Mapa epidemiológico transversal de las ataxias y paraparesias espásticas hereditarias en España. Neurología. 2023 Mar;38(6):379–86.

97. Rodríguez-Labrada R, Velázquez-Pérez L, Auburger G, Ziemann U, Canales-Ochoa N, Medrano-Montero J, et al. Spinocerebellar ataxia type 2: Measures of saccade changes improve power for clinical trials. Movement Disorders. 2016 Apr 1;31(4):570–8.

98. Rodríguez-Labrada R, Fernandez-Ruiz J. Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinicogenetic Aspects, Mechanistic Insights, and Management Approaches. Front Neurol. 2017 Sep;8:472.

99. Higashi M, Ozaki K, Hattori T, Ishii T, Soga K, Sato N, et al. A diagnostic decision tree for adult cerebellar ataxia based on pontine magnetic resonance imaging. J Neurol Sci. 2018 Apr 15;387:187–95.

100. Gazulla J. Spinocerebellar ataxia type 48: last but not least. Neurological Sciences. 2021 Apr 1;42(4):1613–4.

101. Palau F, Espinós C. Autosomal recessive cerebellar ataxias. Orphanet J Rare Dis. 2006 Nov 17;1(1):1–19.

102. Wallace SE, Bird TD. Molecular genetic testing for hereditary ataxia: What every neurologist should know. Neurol Clin Pract. 2018 Feb 1;8(1):27.

103. Pandolfo M. Friedreich ataxia. Arch Neurol. 2008 Oct 1;65(10):1296–303.

104. Fogel BL, Perlman S. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. Lancet Neurol. 2007 Mar 1;6(3):245–57.

105. Shen MM, Rummey C, Lynch DR. Phenotypic variation of FXN compound heterozygotes in a Friedreich ataxia cohort. Ann Clin Transl Neurol. 2024 May 1;11(5):1110–21.

106. Cossée M DA, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, Kostrzewa M, et al. Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. 1999 Feb;45(2):200–2006.

107. Kim YE, Jeon B, Farrer MJ, Scott E, Guella I, Park SS, et al. SCA2 family presenting as typical Parkinson's disease: 34 year follow up. Parkinsonism Relat Disord. 2017 Jul 1;40:69–72.

108. Rodríguez-Quiroga SA, González-Morón D, Arakaki T, Garreto N, Kauffman MA. Amplio espectro fenotípico de la SCA-3: paraparesia espástica hereditaria. Medicina (Buenos Aires). 2013;73(6):552–4.

109. Wolff M, Johannesen KM, Hedrich UBS, Masnada S, Rubboli G, Gardella E, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. Brain. 2017 May 1;140(5):1316–36.

110. Parodi L, Coarelli G, Stevanin G, Brice A, Durr A. Hereditary ataxias and paraparesias: Clinical and genetic update. Curr Opin Neurol. 2018 Aug 1;31(4):462–71.

111. Braga-Neto P, Luiz Pedroso J, Kuo SH, França Junior MC, Afonso H, Teive G, et al. Current concepts in the treatment of hereditary ataxias. Arq Neuropsiquiatr. 2016 Mar;74(3):244–52.

112. Paulson HL, Shakkottai VG, Clark HB, Orr HT. Polyglutamine spinocerebellar ataxias — from genes to potential treatments. Nat Rev Neurosci. 2017 Sep 19;18(10):613.

113. Zesiewicz TA, Wilmot G, Han Kuo S, Perlman S, Greenstein PE, Sarah Y, et al. Comprehensive systematic review summary: Treatment of cerebellar motor dysfunction and ataxia. Neurology. 2018;90(10):464–71.

114. Lynch DR, Chin MP, Boesch S, Delatycki MB, Giunti P, Goldsberry A, et al. Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich's Ataxia: Delayed-Start Analysis of the MOXIe Extension. Movement Disorders. 2023 Feb 1;38(2):313–20.

115. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Doi H, Okubo M, Wada T, et al. Rapid and comprehensive diagnostic method for repeat expansion diseases using nanopore sequencing. npj Genomic Medicine . 2022 Oct 26;7(1):1–15.

116. Stevanovski I, Chintalaphani SR, Gamaarachchi H, Ferguson JM, Pineda SS, Scriba CK, et al. Comprehensive genetic diagnosis of tandem repeat expansion disorders with programmable targeted nanopore sequencing. Sci Adv. 2022 Mar 1;8(9):17.

117. Erdmann H, Schöberl F, Giurgiu M, Leal Silva RM, Scholz V, Scharf F, et al. Parallel in-depth analysis of repeat expansions in ataxia patients by long-read sequencing. Brain. 2023 May 2;146(5):1831–43.

118. Wright GEB, Black HF, Collins JA, Gall-Duncan T, Caron NS, Pearson CE, et al. Interrupting sequence variants and age of onset in Huntington's disease: clinical implications and emerging therapies. Lancet Neurol. 2020;19(11):930–930.

119. Park H, Kim HJ, Jeon BS. Parkinsonism in Spinocerebellar Ataxia. Biomed Res Int. 2015;2015(125273).

120. Saito R, Tada Y, Oikawa D, Sato Y, Seto M, Satoh A, et al. Spinocerebellar ataxia type 17-digenic TBP/STUB1 disease: neuropathologic features of an autopsied patient. Acta Neuropathol Commun. 2022 Dec 1;10(1):177.

8.ANEXOS

8.1. Anexo 1: Consentimiento informado

INFORMACIÓN PARA SUJETOS PARTICIPANTES EN INVESTIGACIÓN Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

"Estudio de las enfermedades neurogenéticas en el Hospital General de Agudos JM Ramos Mejía"

Consultorio de Neurogenética

Centro Universitario de Neurología Dr. JM Ramos Mejía. Facultad de Medicina. UBA.

Este formulario de consentimiento puede tener palabras que usted no entienda. Por favor solicítele al médico o al personal del estudio que le expliquen las palabras o la información que no le parezcan claras. Se le puede suministrar un formulario de consentimiento sin firmar para que lo lleve a casa. Antes de tomar una decisión, puede discutir el formulario de consentimiento con su familia o con sus amigos.

En este formulario de consentimiento ***usted*** *se refiere siempre al sujeto que va a participar en la investigación. De ser usted el representante legal, recuerde por favor que la palabra* ***usted*** *se refiere al sujeto que va a participar en la investigación.*

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
/ 4 MAR. 2015

INTRODUCCIÓN

Se le invita a participar de un estudio de enfermedades neurogenéticas en el Consultorio de Neurogenética del Htal Ramos Mejía. El mismo está destinado a profundizar nuestros conocimientos sobre este grupo de enfermedades y a sistematizar el estudio de las mismas. Por favor tómese el tiempo que necesite para decidir si desea participar.
Es importante que usted sepa que:

a) Los estudios están destinados a adquirir nuevos conocimientos sobre las enfermedades neurogenéticas. Usted podría no beneficiarse con estos conocimientos, pero sí otras personas en un futuro.

b) La participación en un estudio es totalmente voluntaria, usted puede negarse a participar.

c) Usted puede retirarse del estudio en cualquier momento que desee, sin que esto afecte su normal atención en el servicio.

Se le recomienda que le haga todas las preguntas que usted tenga a los investigadores. El investigador (la persona que dirige este estudio de investigación) es el Dr. Kauffman.

¿CUAL ES EL PROPOSITO DEL ESTUDIO DE ENFERMEDADES NEUROGENÉTICAS?

El propósito es aprender acerca de las enfermedades neurogenéticas. Estas son enfermedades hereditarias (que se transmiten de padres a hijos en las familias a través de los genes) y que afectan sobre todo el sistema nervioso (cerebro ,medula espinal, cerebelo, etc). Se lo invita a participar porque creemos que usted podría padecer una enfermedad de este tipo o podría calificar como control voluntario sano.
Los genes son bloques de ADN que se encuentran normalmente en su cuerpo y que contienen la información para la formación de cada una de las partes del cuerpo, con sus características y funciones. Esta información es distinta y única para cada familia y cada persona. Cuando uno de los genes se daña puede aparecer una enfermedad hereditaria.
El diagnóstico definitivo de una enfermedad hereditaria se realiza a través de un test genético que identifica si en el paciente existe la alteración del gen responsable de la misma.
Además aunque sabemos cómo reconocer cuando un paciente tiene una probable enfermedad neurogenetica, no sabemos por qué esto sucede, es decir no sabemos por qué en algún momento de la vida puede aparecer la enfermedad que lo afecta. Para poder conocer más de una enfermedad es habitual que los científicos traten de hacer un modelo para estudiar la enfermedad. Un modelo puede ser un animal de laboratorio que tiene la misma mutación que los pacientes con la enfermedad que ud. padece o pueden ser células que tienen esa mutación. Las células son los componentes de nuestros tejidos que unidas forman nuestro organismo y

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
/ 4 MAR. 2015

que usando técnicas de laboratorio se pueden mantener en cultivo, es decir viviendo en una placa o recipiente plástico para hacer investigaciones. Cuando para hacer un modelo con células se usa una técnica novedosa y específica con la cual se modifican las células en la forma que mejor sirve para la investigación (haciéndolas capaces de poder, por ejemplo, que células de la piel se conviertan en neuronas, lo que podríamos hacer en algunos casos en este estudio) se habla de reprogramación. La metodología de reprogramación usa unas células con potencialidad de convertirse en múltiples tipos de células, estas células reprogramadas son llamadas células pluripotentes inducidas. De ninguna manera el fin de esta investigación, o el uso de estas células es terapéutico (es decir nadie planea usar estas células para el tratamiento de su probable enfermedad neurogenética).

¿CUÁNTAS PERSONAS PARTICIPARÁN EN EL ESTUDIO?

Toda persona que sea evaluada en el Consultorio de Neurogenética será invitada a participar.

¿QUÉ INCLUYE FORMAR PARTE DEL ESTUDIO?

Se le pedirán sus datos de contacto, se le harán preguntas sobre su historia clínica y se le hará un examen físico. Esta información quedará incorporada en un Registro en forma confidencial. También se puede pedir la donación de 15 ml de sangre (aproximadamente dos cucharadas). De la sangre se extraerá el ADN y éste se guardará en el Banco de ADN durante aproximadamente 10 años, con un código de identificación anónimo. Se estudiará su ADN tratando de buscar si existe el daño en los genes responsable de su enfermedad. Es importante que usted sepa que:

a. Se realizarán los test genéticos correspondientes a las enfermedades más frecuentes y de acuerdo a sus padecimientos, pero éstos NO analizan todas las causas posibles de enfermedades hereditarias . Puede haber otros genes que no puedan estudiarse por los métodos convencionales o que no conozcamos. ***Los métodos que utilizaremos podrán ser secuenciación clásica (estudiando un solo gen) o secuenciación genómica masiva, entre otros.***

b. Los estudios genéticos son muy confiables, pero no infalibles. El resultado de un test genético puede estar equivocado. Estos estudios se realizarán en un Laboratorio de Investigación, no en un Centro de Diagnóstico.

Además, a algunos pacientes y/o controles voluntaries sanos les podemos pedir una pequeña porción de su piel (tan pequeña como dos veces el tamaño de las letras de este texto). La pequeña muestra de su piel se obtendrá mediante un procedimiento que se denomina biopsia por sacabocado. Esto significa usar una pequeña pinza que corta un círculo muy pequeño de la piel de su brazo. Para evitar que sienta dolor o muchas molestias realizaremos esta biopsia con anestesia superficial

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACION
/ 4 MAR. 2015

(solo en el lugar donde usaremos la pequeña pinza). Este procedimiento lo realizará un médico dermatólogo que está muy acostumbrado a realizarlo, ya que para el diagnóstico de muchas enfermedades de la piel se hace este tipo de biopsia en forma rutinaria. Habitualmente no queda ninguna cicatriz de esta biopsia. Esta muestra de piel puede servir para general un modelo de estudio de su enfermedad, como le explicábamos más arriba (apartado ¿CUAL ES EL PROPOSITO DEL ESTUDIO DE ENFERMEDADES NEUROGENÉTICAS?)

Durante su atención médica en el consultorio se le podrá realizar: electromiograma, resonancia magnética nuclear, evaluación por un oftalmólogo, evaluación neurocognitiva. Estos exámenes y otros que podrían llegar a requerirse se hacen como parte del estudio de su enfermedad, no con fines de investigación. El electromiograma es una prueba que consiste en recoger la actividad eléctrica de los músculos por medio de pequeñas descargas eléctricas y pinchazos. Antiguamente era una prueba dolorosa, actualmente no es así, pero puede molestar. La resonancia magnética nuclear es un estudio por el que se obtienen imágenes (como "fotos") del cerebro.
La evaluación neurocognitiva son pruebas de rendimiento mental que evalúan memoria, lenguaje, etc. Son llevadas a cabo por una neuropsicóloga en dos o tres visitas de 1 hora aproximadamente.

¿DURANTE CUÁNTO TIEMPO Y CÓMO SE GUARDARÁ MI ADN?

Su ADN se guardará durante 10 años, en el Banco de ADN en forma completamente anónima. Se colocará un número de identificación secreto y sólo los investigadores conocerán a quién corresponde cada muestra de ADN. Además las muestras estarán protegidas bajo llave en el Laboratorio de Neurogenética ***dependiente de la División Neurología*** del ***Htal Gral de Agudos JM Ramos Mejía***
Las muestras de sangre se obtendrán en la División Neurología del Hospital Ramos Mejía. Los análisis genéticos se realizarán en el Laboratorio de Neurogenética ***dependiente de la División Neurología del Htal Gral de Agudos JM Ramos Mejía.***

¿POR CUÁNTO TIEMPO PARTICIPARÉ EN EL ESTUDIO?

Si usted lo desea, participará por ***10*** años. Durante ese tiempo se lo podrá llamar para actualizar sus datos de contacto. Para ello se le pedirá en general nuevos datos o revisaciones clínicas. ***Las muestras o los productos que se obtengan de ellas podrán ser enviados a otras entidades bajo condiciones similares a las del presente consentimiento.***
Usted puede dejar de participar en cualquier momento y en ese caso su muestra será destruida. Si usted decide que no quiere seguir participando, póngase en contacto con cualquier profesional del Equipo del Consultorio y Laboratorio de Neurogenética dirigido por el Dr. Marcelo Kauffman al 4-127-***0280 o 4127***-0348.

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
/ 4 MAR. 2015

¿QUÉ PASARÁ CON MI MUESTRA DE ADN CUANDO CONCLUYA EL ESTUDIO?

Usted seguirá siendo el dueño de su muestra ***y tiene*** el derecho de pedir que se destruya su muestra en cualquier momento al comunicarse con el Médico del Estudio. El Consultorio de Neurogenética tiene la responsabilidad de destruir la(s) muestra(s) si usted lo solicita o al final del período de almacenamiento, siempre que esto sea tecnicamente posible.
El Consultorio de Neurogenética, las instituciones de las que depende el consultorio o sus investigadores y aquellas instituciones o investigadores con los cuales puedan suscribirse acuerdos de colaboración para investigación, serán los dueños exclusivos de los datos, descubrimientos y materiales derivados de las muestras, sin derecho a compensación económica por parte del sujeto participante.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DEL ESTUDIO?

Los riesgos relacionados con la recolección de datos y los análisis de ADN incluyen:

- Riesgo de obtener un resultado equivocado. Las pruebas genéticas en un porcentaje pequeño pueden equivocarse.

- Obtener la información que se podría descubrir con pruebas genéticas: Usted puede sentirse afectado emocionalmente si conoce información sobre sus genes que signifique padecer una enfermedad futura y riesgo de transmitirla a su familia.

- Las relaciones con sus familiares se podrían ver afectadas ya que las personas reaccionan con este tipo de información de distintas maneras. Algunas personas en su familia podrían decidir que no quieren ***conocer*** información genética acerca de sí mismos. Usted podría decidir que tampoco quiere recibir la información.

- Las entrevistas y los cuestionarios acerca de las relaciones familiares y enfermedades en ocasiones podrían causar estrés. Usted puede en cualquier momento dejar de participar en la entrevista y dejar de completar los cuestionarios.

Los riesgos relacionados con la extracción de sangre son:

- ***Usted*** podría tener un poco de molestia o dolor en el lugar del pinchazo con la aguja. Existen riesgos improbables de desmayo o infección local.

Se podrían presentar riesgos adicionales que no se pueden anticipar en la actualidad. Estos se deben considerar cuidadosamente antes de participar en este estudio.
Para más información acerca de los riesgos y efectos secundarios, usted puede preguntar a cualquier profesional del Equipo del Consultorio y

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
/ 4 MAR. 2015

Laboratorio de Neurogenética o al Investigador principal Dr. Marcelo Kauffman al 4-127-0348 o al ***4127-0280.***

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?

Es posible que al participar en este estudio no haya beneficio directo para usted o su familia. Usted podría sentirse satisfecho al saber que ayuda a los investigadores a que tengan un mejor entendimiento de la enfermedad que le afecta.

También, podría haber otros beneficios que no podemos anticipar en la actualidad.

Su decisión acerca de la participación debe basarse en el interés de avanzar en la investigación. Es posible que no se obtenga información específica acerca de los riesgos de salud actuales o en el futuro. Usted también puede decidir que quiere participar pero sin que le den información a pesar de que pudiese estar disponible.

¿QUÉ ME PUEDEN DECIR ACERCA DE LA CONFIDENCIALIDAD?

Se hará todo lo posible para proteger su información personal según lo permita la ley. Los expedientes médicos de los participantes en el estudio de investigación se archivan y mantienen de acuerdo con los requisitos legales. No se le identificará en ningún informe o publicación que resulte de este estudio.

Las organizaciones que podrían solicitar, inspeccionar o copiar sus expedientes médicos y de investigación para control de calidad y análisis de información incluyen grupos tales como: la Administración Nacional de Medicamentos, Tecnología y Alimentos (ANMAT por sus siglas), la Comisión de Bioética del comité de Docencia del Hospital Ramos Mejía.

DIVULGACIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

Ud. podrá pedir a los investigadores que le informen acerca de los resultados de los análisis genéticos. La información únicamente se divulgará en los casos en los cuales existe una prueba genética. Sugerimos que usted incluya a su médico de cabecera para que pueda ayudar a contestarle sus preguntas y hacer un seguimiento de su tratamiento y asesoramiento. Usted es la única persona a la cual se divulgará su información genética y ninguna otra persona o miembro de su familia recibirá la información. Algunos resultados genéticos podrían tener implicaciones en el tratamiento y otros no lo tendrán. Usted puede cambiar de opinión en cualquier momento. Si usted desea cambiar de opinión, por favor comuníquese con el investigador principal y le enviarán los documentos correspondientes.

Por favor señale con una cruz si usted quiere conocer los resultados de los test genéticos y firme a continuación:

------- ***Opción 1:*** Si, deseo ser informado de los mismos

------- ***Opción 2:*** No, prefiero no ser informado de los mismos

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACION
/ 4 MAR. 2015

Aclaración

Fecha

Firma

(en caso de ser menor de edad se requiere firma de padre o tutor)

CONSIDERACIONES RESPECTO A ESTUDIOS DE SECUENCIACIÓN GENÓMICA MASIVA

En caso de ser necesario su muestra podrá ser procesada para realizar estudios de secuenciación genómica masiva. A continuación se detalla la información pertinente para estos casos.

Descripción de la prueba de secuenciación genómica masiva
La secuenciación genómica masiva es una prueba muy compleja que ha sido recientemente desarrollada para la identificación de los cambios en el ADN de un individuo que son causa o están relacionados con su enfermedad. Puede secuenciarse el genoma completo de un individuo o el exoma que se refiere a la porción del genoma humano que contiene secuencias funcionalmente importantes de AND. Se cree que la secuenciación genómica es un método eficaz de analizar el ADN de un paciente para descubrir la causa genética de enfermedades o discapacidades. Sin embargo, es posible que aunque la secuenciación genómica identifique la causa genética subyacente de la enfermedad en su familia esta información no sea capaz de ayudar a conocer el pronóstico o cambiar el tratamiento de la enfermedad médica.

¿Qué se informa?
• Los cambios genéticos que pueden haber causado los signos y síntomas de su enfermedad
• Los cambios genéticos que se encuentran en los genes no relacionados con su enfermedad, pero que pueden tener un impacto importante en la salud, a menos que usted decida que no desea esta información.
• En caso de que se estudien, los cambios genéticos identificados en los familiares relacionados con los signos y síntomas del paciente se incluirán en el informe del paciente.
Limitaciones de este tipo de prueba
Para secuenciación del exoma:
• Aproximadamente el 85-92% de los exones se puede secuenciar por esta prueba.
• Esta prueba no secuencia cada exón lo suficientemente bien como para encontrar todas las mutaciones en cada exón.
• Sólo detecta cambios de pares de bases o pequeñas adiciones o supresiones de ADN. Esta prueba no detecta otros tipos de mutaciones.
• Es importante tener información clínica fiable y una historia exacta de la familia con el fin de interpretar los resultados correctamente. Es más probable encontrar una causa genética de la enfermedad de un paciente cuando varios miembros de la familia se analizan al mismo tiempo.

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

/ 4 MAR. 2015

• *Aproximadamente el 70% de los pacientes no reciben un diagnóstico o sospecha diagnóstica de esta prueba ya que los hallazgos no alcanzan para saber cual es la causa genetica de la enfermedad que estamos estudiando.*
• *Los resultados normalmente no predicen la gravedad o la edad de comienzo de una condición particular.*

Riesgos implicados

- Ninguna prueba de laboratorio, incluyendo secuenciación genómica masiva, es 100% exacto.
- Un diagnóstico genético sugerido puede ser incorrecto.
- El verdadero diagnóstico puede no ser descubierto por esta prueba.
- Usted puede recibir resultados inciertos.
- Esta prueba puede revelar que las relaciones biológicas en una familia no son lo que parecen.

Hallazgos incidentales

Mediante secuenciación genómica masiva se pueden encontrar algunos cambios genéticos que no están relacionados con los signos y síntomas (hallazgos secundarios) actuales que Usted presenta. Sin embargo, estos hallazgos pueden tener implicancias importantes para su salud y la de sus familiares. Por lo que se pueden incluir hallazgos incidentales en el informe de su estudio. No los buscaremos ni informaremos de sus conclusiones, si usted decide que no quiere este tipo de resultados. Si opta por recibir estos resultados, el informe del paciente incluirá esta información.

_____ ***Opción I: Elijo recibir los resultados sobre los trastornos genéticos que pueden afectar la salud de mi / mi hijo ahora o en el futuro.***

_____ ***Opción II: decido no recibir los resultados sobre los trastornos genéticos que no estén relacionados con mis/mi hijo síntomas o signos actuales. Entiendo que no voy a tener acceso a los resultados más tarde.***

---------- ---------- -------

Aclaración ***Fecha*** ***Firma***

(en caso de ser menor de edad se requiere firma de padre o tutor)

¿CUÁNTO COSTARÁ?

Usted no tendrá que pagar para participar del presente Estudio.
Si usted experimenta cualquier efecto secundario como resultado directo de su participación en el estudio, su tratamiento será brindado por el Hospital General de Agudos Dr. JM Ramos Mejía. La atención en el hospital es absolutamente gratuita. Usted no recibirá pago alguno debido a su participación en este estudio ***ni compensación económica generada a partir de los datos, descubrimientos o materiales derivados de las muestras.***

Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
/ 4 MAR. 2015

¿CUÁLES SON MIS DERECHOS COMO PARTICIPANTE?

La participación es voluntaria. Usted puede decidir que no quiere participar o puede retirarse en cualquier momento. Si usted decide no participar o deja de participar, su atención rutinaria no se verá afectada y usted no renuncia a la atención médica que usted recibiría normalmente. Usted no abandona ninguno de sus derechos legales como participante en investigación, ni quita la responsabilidad de su médico sobre usted por firmar este consentimiento escrito.
Le avisaremos si hay información adicional que podría afectar su salud, bienestar o participación en el Registro.

¿A QUIÉN PUEDO LLAMAR SI TENGO PREGUNTAS O PROBLEMAS?

Para hacer preguntas acerca del estudio o de algún daño relacionado con la investigación, puede comunicarse con los investigadores, Dr. Sergio Rodríguez, Dra. Marta Córdoba, Dra. González Morón y el Dr. Marcelo Kauffman al 4-127-0348 o ***al 4127-0280.***
Si tiene alguna duda de sus derechos en la participación del estudio, por favor comuníquese con la Comisión de Bioética/ Comité de Docencia e Investigación del Hospital Gral. de Agudos JM Ramos Mejía- Urquiza 609-Buenos Aires. Teléfonos: 4127-0288/4-127-0439.

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Hospital Gral. de Agudos "J.M. Ramos Mejía"
COMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
11 MAR 2015

8.1. Anexo 2: Escala de SARA

Escala para la Evaluación y Calificación de la Ataxia

Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)

1 Marcha

Se pide (1)que camine a una distancia segura paralela a una pared, incluyendo una media vuelta (girar para mirar hacia la dirección opuesta de la marcha) y (2) quecamine en tándem (tocando con el talon los dedos del pie contrario) sin apoyo.

- **0. Normal, sin dificultades para caminar, girar y caminar en tándem (hasta un paso en erróneo permitido)**
- **1. Dificultades leves, solo visibles al caminar 10 pasos consecutivos en tándem**
- **2. Claramente anormal, caminar en tándem >10 pasos no es posible**
- **3. Marcha tambaleante considerable, dificultadesen la media vuelta, pero sin soporte**
- **4. Marcha tambaleante marcada, soporte intermitente de la pared requerido**
- **5. Marcha tambaleante severa, soporte permanente en un palo o soporte ligero por unbrazo requerido**
- **6. Camina > 10 m solo con soporte fuerte (dos bastones o caminador o acompañante)**
- **7. Camina < 10 m solo con un soporte fuerte (dos bastones o caminador o acompañante)**
- **8. No puede caminar, incluso apoyado**

Puntuación	

2 Bipedestación

Se pide que esté de pie (1) en posición natural, (2) con los pies juntos en paralelo y en tándem (ambos pies en una línea, sin espacio entre el talón y el dedo del pie). Sin zapatos y con los ojos están abiertos. Para cada condición, se permiten tres ensayos. El mejor ensayo es elque se califica.

- **0. Normal, capaz de estar de pie en tándem durante > 10 s**
- **1. Capaz de estar de pie con los pies juntos sin balancearse, pero no en tándem durante > 10 s**
- **2. Capaz de estar de pie con los pies juntos durante > 10 s, pero solo con balanceo**
- **3. Capaz de estar de pie durante > 10 s sin apoyo en posición natural, pero no con los pies juntos**
- **4. Capaz de estar de pie durante >10 s en posición natural solo con soporte intermitente**
- **5. Capaz de estar de pie >10 s en posición natural solo con soporte constante de un brazo**
- **6. Incapaz de permanecer de pie durante >10 s incluso con el apoyo constante de un brazo**

Puntuación	

3) Sedestación

Se pide que se siente en una cama de examen sin el apoyo de los pies, los ojos abiertos y los brazos extendidos hacia el frente.

- **0 Normal, sin dificultades para sentarse >10 segundos**
- **1 Dificultades leves, balanceo intermitente**
- **2 Balanceo constante, pero capaz de sentarse > 10 s sin soporte**
- **3 Capaz de sentarse durante > 10 s solo con soporte intermitente**
- **4 Incapaz de sentarse durante >10 s sin soporte continuo**

Puntuación	

4) Alteración en el habla

El habla se evalúa durante la conversación normal.

- **0 Normal**
- **1 Sugerencia de alteración del habla**
- **2 Habla deteriorada, pero fácil de entender**
- **3 Palabras ocasionales difíciles de entender**
- **4 Muchas palabras difíciles de entender**
- **5 Solo palabras individuales comprensibles**
- **6 Habla ininteligible / anartria**

Puntuación	

5) Persecución de los dedos

Clasificar por separado para cada lado

Sentado cómodamente. Si es necesario, se permite el apoyo de los pies y el tronco. El examinador se sienta frente y realiza 5 movimientos consecutivos repentinos y rápido en direcciones impredecibles en un plano frontal, aproximadamente al 50 % del alcance. Los movimientos tienen una amplitud de 30 cm yuna frecuencia de 1 movimiento cada 2 s. Se le pide que siga los movimientos con su dedo índice, acercando el dedo al del examinador, lo más rápido y preciso posible. Se califica el rendimiento promedio de los últimos 3 movimientos.

- **0 Sin dismetria (lleva su dedo al objetivo esperado)**
- **1 Dismetría, lleva el dedo al objetivo inferior / excesivo <5 cm**
- **2 Dismetría, lleva el dedo al objetivo inferior / excesivo <15 cm**
- **3 Dismetría, lleva el dedo al objetivo inferior / excesivo >15 cm**
- **4 No se pueden realizar 5 movimientos de puntería**

Puntuación	**Derecha**	**Izquierda**
Media de ambos lados (D+I)/2		

6) Test nariz-dedo

Clasificar por separado para cada lado

Sentado cómodamente. Si es necesario, se permite el apoyo de los pies y el tronco. Se le pide que apunte repetidamente con su dedo índice desde su nariz hasta el dedo del examinador que está frente a aproximadamente el 90 % del alcance. Los movimientos se realizan a velocidad moderada. El rendimiento promedio de los movimientos se clasifica de acuerdo con la amplitud del temblor cinético.

- **0 Sin temblor**
- **1 Temblor con una amplitud < 2 cm**
- **2 Temblor con una amplitud < 5 cm**
- **3 Temblor con una amplitud > 5 cm**
- **4 Incapaz de realizar 5 movimientos**

Puntuación	**Derecha**	**Izquierda**
Media de ambos lados (D+I)/2		

7) Movimientos de las manos alternos rápidos

Clasificar por separado para cada lado

Sentado cómodamente. Si es necesario, se permite el apoyo de lospies y el tronco. Se le pide que realice 10 ciclos de alternancia repetitiva de pro- y supinaciones de la mano en su muslo tan rápido y tan preciso como sea posible. El movimiento es demostrado por el examinador a una velocidad de aproximadamente 10 ciclos dentro de 7 s. Se deben tomar los tiempos exactos para la ejecución del movimiento.

- **0 Normal, sin irregularities (realiza <10s)**
- **1 Ligeramente irregular (realiza <10s)**
- **2 Claramente irregular, movimientos individuales difíciles de distinguir o interrupciones relevantes, pero realiza <10s**
- **3 Muy irregular, movimientos individuales difíciles de distinguir o interrupciones relevantes, realiza >10s**
- **4 Incapaz de completer 10 ciclos**

Puntuación	**Derecha**	**Izquierda**

8) Deslizar el talón por la espinilla

Clasificar por separado para cada lado

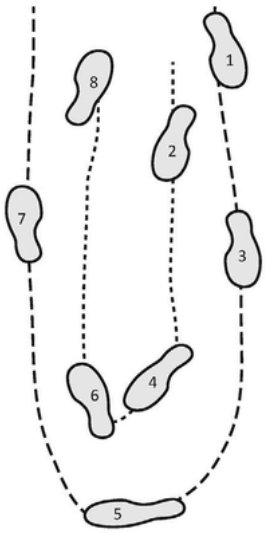
Tumbado boca arriba sin ver sus piernas. Se le pide que levante una pierna, apunte con el talón a la rodilla opuesta, se deslice haciaabajo a lo largo de la espinilla hasta el tobillo y coloque la pierna hacia atrás. La tarea se realiza 3 veces. Los movimientos de deslizamiento hacia abajo deben realizarse dentro de 1 segundo. Sila se desliza hacia abajo sin contacto con la espinilla en los tres ensayos, anotar 4.

- **0 Normal**
- **1 Ligeramente anormal, contacto con la espinilla mantenida**
- **2 Claramente anormal, se separa de la espinilla hasta 3 veces durante 3 ciclos**
- **3 Severamente anormal, se separa de la espinilla 4 o más veces durante 3 ciclos**
- **4 Incapaz de realizar la tarea**

Puntuación	**Derecha**	**Izquierda**

Media de ambos lados (D+I)/2		Media de ambos lados (D+I)/2	

1. Marcha



Media vuelta

Marcha en tándem

2. Bipedestación

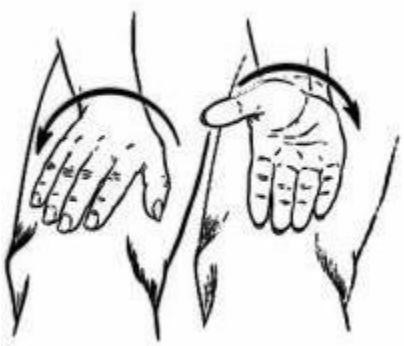
Pies paralelos Pies en tandem

3.Sedestación

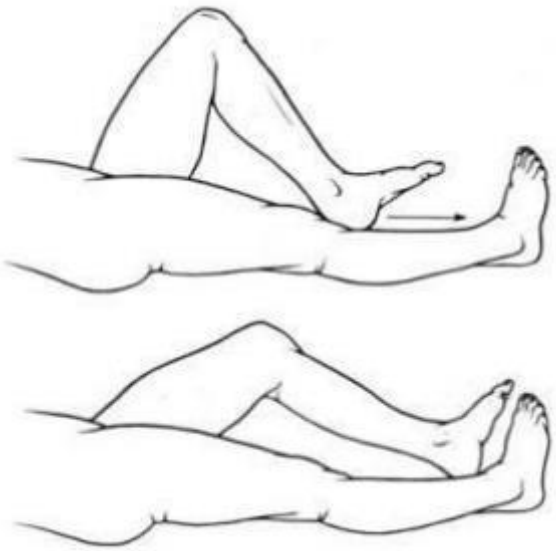
5. Persecución de los dedos

6. Test naríz- dedo

7. Movimientos de las manos alternos



8. Deslizar el talón por la espinilla



8.3. Anexo 3: panel multigénico

Panel multigénico virtual asociado a Ataxias de causa genética. La lista incluye a los genes asociados a ataxias hereditarias, obtenidos a partir de diversas bases de datos. Este panel fue utilizado para la priorización de variantes durante el análisis bioinformático de los casos estudiados por secuenciación de panel de genes, exoma completo o genoma completo.

ABCB7	*C5ORF42*	*DNMT1*	*KCNC3*	*NPC1*	*RUBCN*	*TDP1*	*ZFYVE26*
ABHD12	*C10ORF2*	*EBF3*	*KCND3*	*NPC2*	*RNF216*	*TMEM138*	*ZNF423*
ACO2	*CA8*	*EEF2*	*KCNJ10*	*NPHP1*	*RPGRIP1L*	*TGM6*	
ADCK3	*CACNA1A*	*ELOVL4*	*KIF1C*	*NUBPL*	*SACS*	*TMEM67*	
AFG3L2	*CACNB4*	*ELOVL5*	*KIAA0226*	*OFD1*	*SCARB2*	*TMEM237*	
AHI1	*CAMTA1*	*FA2H*	*KIF7*	*OPA1*	*SCN2A*	*TMEM240*	
ALDH5A1	*CAPN1*	*FBXL4*	*LAMA1*	*OPHN1*	*SETX*	*TPP1*	
ANO10	*CASK*	*FDXR*	*LARS2*	*PAX6*	*SIL1*	*TRIM32*	
APTX	*CC2D2A*	*FGF14*	*LMNB1*	*PDYN*	*SLC1A3*	*TSFM*	
ARL6	*CCDC88C*	*FLVCR1*	*LRPPRC*	*PEX7*	*SLC2A1*	*TTBK2*	
ARL13B	*CEP41*	*FMR1*	*MARS2*	*PHYH*	*SLC9A6*	*TTC8*	
ATCAY	*CEP290*	*FXN*	*MKKS*	*PIK3R5*	*SLC20A2*	*TTC19*	
ATG5	*CLCN2*	*GBA2*	*MKS1*	*PMPCA*	*SLC25A46*	*TTPA*	
ATM	*CLN5*	*GFAP*	*MME*	*PNKD*	*SLC52A2*	*TUBB4A*	
ATP1A3	*CLPP*	*GOSR2*	*MRE11A*	*PNKP*	*SNX14*	*TXN2*	
ATP8A2	*COASY*	*GRID2*	*MTFMT*	*PNPLA6*	*SPG7*	*UBA5*	
BBS1	*COX20*	*GRM1*	*MTPAP*	*POLG*	*SPTBN2*	*VAMP1*	
BBS2	*COQ8A*	*GSS*	*MTTP*	*POLR3A*	*STUB1*	*VLDLR*	
BBS4	*CP*	*HARS2*	*NDUFAF6*	*POLR3B*	*SYNE1*	*VWA3B*	
BBS5	*CSTB*	*HIBCH*	*NDUFS2*	*PPP2R2B*	*SYT14*	*WDR73*	
BBS7	*CWF19L1*	*INPP5E*	*NDUFS4*	*PRKCG*	*TCTN1*	*WDR81*	

BBS9	*CYP2U1*	*KCNA1*	*NDUFV1*	*PRNP*	*TCTN2*	*WFS1*
BBS10	*CYP27A1*	*KCNA2*	*NOL3*	*PRRT2*	*TCTN3*	*WWOX*