



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL



BIOTECNOLOGIA
INDUSTRIAL

**Tesis Presentada en Opción al Título Académico de
Máster en Biotecnología
Mención Biotecnología Industrial**

Título

**Desarrollo de un método analítico para estudiar la
metilación del promotor del gen *Atxn2*.**

Autor: Lic. Dennis Almaguer Gotay.

Tutores: Dra. C. Suyén Rodríguez Pérez.

MSc. José Miguel Laffita Mesa.

Asesor: Dr. C. Luis C. Velázquez Pérez.

2010

AÑO 52 DE LA REVOLUCIÓN

RESUMEN.

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 -SCA2- es una enfermedad neurodegenerativa y hereditaria, relacionada etiológicamente con la expansión del número de repeticiones del trinucleótido CAG en el gen *Atxn2*. La SCA2 en Holguín, Cuba, se caracteriza por exhibir la más alta tasa de prevalencia a nivel mundial. Ello y la inexistencia de un tratamiento curativo o algún paliativo, han conducido al estudio de la enfermedad desde diversos enfoques con el fin de encontrar posibles dianas terapéuticas. En este sentido, demostrar si el método analítico “reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación” (MSP, *por sus siglas en inglés*) es útil para analizar el patrón de metilación del promotor del gen *Atxn2*, es una necesidad para futuras investigaciones. Como resultado del trabajo se estandarizaron dos variantes analíticas de la MSP para la SCA2; evidenciándose una alta sensibilidad de la técnica desarrollada. Particularmente, empleando oligonucleótidos diseñados para estudiar secuencias hipermetiladas, el límite inferior de detección se alcanza alrededor de las 10 genocopias. Se demostró que en el gen *Atxn2* la región núcleo del promotor enmarca 250 pb, está embebida en un típico islote CpG y es susceptible al reconocimiento por factores transcripcionales como Sp1. El uso de la MSP desarrollada y utilizada para investigar el estado de metilación de la región promotora del gen *Atxn2* fue efectiva para demostrar cualitativamente que el estado de metilación pudiera afectar la expresión del gen y el fenotipo clínico de la enfermedad.

SUMMARY.

The Spinocerebellar Ataxia Type 2 –SCA2- is an inherited and neurodegenerative disease caused by a CAG expansion at the SCA2 locus (ATXN2).

SCA2 reaches the highest prevalence at worldwide scale in Holguin Cuba. This fact and the absence of palliative or a therapeutic treatment have drove to study the SCA2 from diverse approaches in order to find new therapeutic targets.

In this sense, to demonstrate whether the Methylation Sensitive PCR -MSP- is useful to analyze the methylation pattern of the ataxin-2 promoter is a mandatory goal for find new biomarkers and therapeutic targets.

Here we standardized two MSP variants assays based on PCR approaches for the SCA2 gene. These MSP was highly sensitive with detection thresholds up to 10 copies of DNA hyper or hypo methylated. We demonstrated that the core promoter harbor 250bp and embedded in a typical CpG island and with high level of methylatable CpG and with recognition sites for Sp1factors. The MSP was used for the research in the SCA2 context and was effective for the qualitative demonstration that the methylation would affect the gen expression and the phenotype in SCA2.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
II.1. La ataxia espinocerebelosa tipo 2.	3
II.1.1. <i>Correlación genotipo-fenotipo</i>	3
II.1.2. <i>Genética molecular y expresión</i>	4
II.2. Metilación del ADN y su contribución a la SCA2.....	7
II.2.1. <i>Metilación y expresión génica</i>	7
II.2.2. <i>Metilación alelo-específica en el gen Atxn2 y fenotipo de la SCA2</i>	9
II.2.3. <i>Métodos analíticos para el estudio de la Metilación</i>	10
III. PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS.	12
III.1. Metodología experimental.	12
III.1.1. <i>Selección de la muestra a estudiar</i>	12
III.1.2. <i>Ética de la investigación</i>	12
III.2. Métodos analíticos y bioinformáticos utilizados.	13
III.2.1. <i>Aislamiento de ADN</i>	13
III.2.2. <i>Determinación de la concentración del ADN</i>	13
III.2.3. <i>Modificación del ADN genómico</i>	13
III.2.4. <i>Análisis y Predicción de la región promotora del gen Atxn2</i>	14
III.2.5. <i>Análisis y Predicción del islote de CpG</i>	14
III.2.6. <i>Predicción de sitios sensibles a metilación</i>	15
III.2.7. <i>Diseño de oligonucleótidos para PCR sensible a metilación (MSP)</i>	15
III.2.7.1. <i>Determinación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos</i>	15
III.2.8. <i>Estandarización de la técnica MSP</i>	16
III.3. Análisis estadístico.	16
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
IV.1. Estructura del gen <i>Atxn2</i>	17
IV.2. Diseño de oligonucleótidos para estudiar la metilación mediante la MSP.....	22
IV.3. Estandarización de la MSP.	25
IV.3.1. <i>Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para la MSP</i>	25
IV.3.2. <i>Estudio de la especificidad y sensibilidad del método diseñado</i>	27
IV.4. Empleo de la MSP en la investigación de la SCA2.....	34
IV.4.1. <i>Metilación como elemento de diferenciación intrafamiliar</i>	34
IV.4.2. <i>Metilación como elemento distintivo de individuos no emparentados</i>	41
IV. CONCLUSIONES.....	46
V. RECOMENDACIONES.....	47
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	48

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

1. Adenina -A-
2. ADN metiltransferasas -DNMTs-
3. Ataxia espinocerebelosa tipo 2 -SCA2-
4. Ataxia espinocerebelosa tipo 3 -SCA3-
5. CentiMorgan -cM-
6. Citosina -C-
7. CpG metilables -CpGm-
8. Desoxirribonucleótidos -dNTP-
9. Enzima de restricción -KPN1-
10. Enzima de restricción -SAC1-
11. Gen codificante para la ataxina-2 -*Atxn2*-
12. Gen codificante para la proteína fosfolipasa 2 -*Pla2*-
13. Guanina -G-
14. Identidad del factor de transcripción -TFD-
15. Motivos de empalmes -SM-
16. Número de repeticiones del triplete citosina, adenina y guanina -(CAG)_n-
17. Oligonucleótidos diseñados para reconocer secuencias hipermetiladas -MP-
18. Oligonucleótidos diseñados para reconocer secuencias no metiladas -UP-
19. Factores de transcripción -TF-
20. Pares de bases -pb-
21. Patrón de peso molecular -PM-
22. PCR metil específica anidada -nested-MSP-
23. PCR metil específica -MSP-
24. Proteína ataxina-2 -ATXN2-
25. Proteína de unión a CpG metilados -MECP-.
26. Proteínas de unión a poli(A) -PABP-
27. Reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación con el empleo de oligonucleótidos diseñados para estudiar secuencias nucleotídicas no metiladas -MSP-UP-
28. Reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación con el empleo de oligonucleótidos diseñados para estudiar secuencias nucleotídicas hipermetiladas -MSP-MP-
29. Reacción en cadena de la polimerasa -PCR-
30. Región no traducible -UTR-
31. S-adenosilhomocisteína -SAH-
32. S-adenosilmetionina -SAM-
33. Temperatura de alineamiento o hibridación -TM-
34. Timina -T-

I. INTRODUCCIÓN.

La ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2, *por sus siglas en inglés*) es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por degeneración cerebelosa y de vías relacionadas. La tasa de prevalencia de la SCA2 a nivel internacional es de 1-5/10⁵ habitantes; sin embargo en Holguín, Cuba, alcanza hasta 43/10⁵ habitantes (Velázquez et al., 2009). Este hecho, unido al curso progresivo e invalidante de la enfermedad, la convierte en un serio problema de salud.

Etiológicamente, la SCA2 se debe a la expansión anómala del triplete CAG en la región codificante del gen de la ataxina-2 (*Atxn2*) (OMIM 601517). La mutación genética da lugar a una proteína con un dominio poliglutamínico expandido cuya función fisiológica no se conoce del todo, aunque se ha sugerido su relación con el metabolismo del ARN mensajero (Satterfield y Pallanck, 2006; Lastres-becker et al., 2008; Riverón, 2008; van de Loo et al., 2009).

Al igual que otros padecimientos neurodegenerativos causados por proteínas con secuencias poliglutamínicas expandidas (Anexo No.1), la SCA2 muestra una correlación inversa muy fuerte entre la expansión de la secuencia repetitiva del triplete CAG y el momento de aparición de los signos clínicos de la enfermedad o edad de inicio (Brusco et al., 2004), explicando el 60 % de la variabilidad fenotípica (Pulst et al., 1996; Pulst et al., 2003; Leznicki, 2005; van de Warrenburg et al., 2005). El restante 40% es atribuible a otros factores genéticos, epigenéticos, ambientales y sus interacciones (Chattopadhyay et al., 2003; Brusco et al., 2004; Pulst et al., 2005).

La metilación *de novo* alelo específica, un factor epigenético estrechamente vinculado a la regulación de la expresión genética, podría ser una fuente importante de varianza en la expresión clínica de la SCA2. La estructura genómica del promotor *Atxn2*, así como la proximidad de este a la mutación causante de la SCA2, hace atractiva la hipótesis (Aguilar et al., 1999).

En el contexto de la SCA2, la metilación *de novo* como modulador de la expresión clínica ha sido descrito de manera insuficiente (Bauer et al., 2004). Sin embargo, su completa comprensión podría conducir a estrategias terapéuticas, la correcta

planificación y estratificación de ensayos clínicos, así como al mejoramiento del asesoramiento genético de familiares y sujetos presintomáticos.

La baja tasa de prevalencia de la SCA2 a nivel mundial, así como el reciente redescubrimiento de la epigenética y el desarrollo de tecnologías para su estudio, justifican la ausencia de procedimientos analíticos necesarios para describir la metilación y han contribuido además a los pobres resultados alcanzados en relación a la investigación de la metilación *de novo* en la SCA2. Teniendo en cuenta lo anterior, desarrollar en nuestro país un método analítico dirigido a estudiar los patrones de metilación en la SCA2 está claramente justificado.

Problema

La ausencia de procedimientos analíticos para describir la metilación en el contexto de la SCA2, limita el análisis de la contribución de este factor a la variabilidad fenotípica.

Hipótesis

Dada la alta sensibilidad y especificidad del método de reacción en cadena de la polimerasa -PCR-, es posible el desarrollo un método analítico que permita investigar el estado de metilación en el gen *Atxn2*.

Objetivos

General:

- Desarrollar una técnica analítica de PCR sensible a metilación -MSP- para describir el patrón de metilación del promotor del gen *Atxn2*.

Específicos:

- Determinar la estructura del promotor del gen *Atxn2*.
- Diseñar oligonucleótidos sensibles y específicos para detectar la metilación.
- Establecer condiciones experimentales óptimas para la técnica MSP en el contexto de la SCA2.
- Demostrar si la MSP es adecuada para analizar el patrón de metilación del promotor del gen *Atxn2*.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

II.1. La ataxia espinocerebelosa tipo 2.

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, es una enfermedad hereditaria causada por la expansión anómala de la secuencia repetitiva del triplete CAG en la región codificante del gen de la ataxina-2 -ATXN2-, que sigue un patrón de herencia autosómico dominante (OMIM 601517).

II.1.1. *Correlación genotipo-fenotipo.*

La SCA2, como ya se ha referido, es causada por la expansión anómala del triplete CAG en la región codificante del gen de la ATXN2 (OMIM 601517).

Al igual que otras enfermedades poliglutamínicas, este padecimiento se caracteriza por una importante correlación inversa entre la edad de inicio y el tamaño de la expansión -(CAG)_n, siendo considerada ésta como un importante parámetro predictivo ([van de Warrenburg et al., 2005](#); [Kaplan et al., 2007](#)). Sin embargo, dada la gran variabilidad observada en la edad de inicio y del cuadro clínico en sentido general, incluso en personas con el mismo (CAG)_n, los modelos matemáticos basados en el uso exclusivo de este marcador no deberían utilizarse para predecir la edad de inicio más probable a la que podría enfermar un sujeto asintomático portador de un alelo SCA2 expandido ([Cancel et al., 1997](#); [Mederos et al., 2008](#); [Almaguer et al., 2010](#)).

El rango más amplio de variabilidad en la edad de inicio es observado en individuos con menos de 40 (CAG), pues para secuencias más largas la variabilidad es menor. Por otro lado, los alelos con más de 45 (CAG) han sido asociados con el comienzo de la enfermedad antes de los 20 años de edad ([Pulst et al., 1996](#), [Cancel et al., 1997](#); [Santos et al., 1999](#); [van de Warrenburg et al., 2005](#); [Globas et al., 2008](#)). Sin embargo, no ha sido encontrada una correlación significativa entre el (CAG)_n y el estatus cognitivo ([Burk et al., 1999](#); [Le-Pira et al., 2002](#); [Ramocki et al., 2008](#)).

En una serie de 111 pacientes con SCA2, pertenecientes a 32 familias de diferentes orígenes, fue encontrado enlentecimiento de los movimientos oculares en el 56 % de los casos, fasciculaciones en el 25% y distonía en el 9%. El (CAG)_n

fue mayor en los pacientes con distonía, mioclonus y mioquimia; mientras que tanto el (CAG)_n como la duración de la enfermedad influyeron en la frecuencia de la disminución de los reflejos, además del sentido de la vibración en las extremidades inferiores, la amiotrofia, las fasciculaciones y el enlentecimiento de los movimientos oculares (Cancel et al., 1997).

II.1.2. Genética molecular y expresión.

➤ Gen *Atxn2*.

El gen causante de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 -*Atxn2*- fue inicialmente mapeado por Gispert y colaboradores en el intervalo comprendido entre los marcadores *Pla2* (fosfolipasa 2) y *D12ss8*, en la región cromosómica 12q23-24.1 (Gispert et al., 1993). Dos años después, los mismos autores redujeron la región candidata para la localización del gen *Atxn2* hasta 1 cM -un millón de pares de bases (pb)-; lo que permitió excluir el gen de la D-amino-oxidasa como candidato de la enfermedad (Gispert et al., 1995).

El gen *Atxn2*, fue finalmente identificado en 1996 por tres grupos de investigadores siguiendo diferentes estrategias, a través de las cuales demostraron que la mutación consistía en la expansión de una secuencia de CAG situada en el primer exón del gen (Imbert et al., 1996; Pulst et al., 1996; Sanpei et al., 1996). A partir de entonces ha sido evidenciado que tanto los alelos normales como los expandidos son polimórficos para el (CAG)_n en diferentes poblaciones humanas, conteniendo entre 13-30 CAG los primeros y entre 32-79 CAG los expandidos; aunque han sido reportados casos extremos con 200 a 500 CAG (Santos et al., 1999; Mao et al., 2002; Moretti et al., 2004; Alluri et al., 2007). Ha sido descrito además que los alelos normales tienen de 1 a 3 interrupciones de CAA con la secuencia: (CAG)₈ CAA (CAG)₄ CAA (CAG)₈, mientras que el 95 % de los alelos expandidos no tienen interrupciones (Pulst et al., 1996; Sobczak y Krzyzosiak, 2005).

La región codificadora del gen *Atxn2* consiste de 4500 pares de bases y está dividida en 25 exones que contienen entre 37 y 890 pb; mientras que los intrones presentan desde 323 pb hasta más de 15 kb de longitud (Lastres-becker et al.,

2008). El análisis de las secuencias de ruptura/unión indicó la presencia de sólo una desviación de la regla GT-AG en el sitio donante del intrón 9, que contuvo un GC en lugar del GT típico (Sahba et al., 1998).

➤ Ataxina-2.

La ataxina-2, producto de la expresión del gen *Atxn2*, es una proteína de 1312 aminoácidos. Tiene un dominio ácido dentro del que se encuentran dos motivos vinculados al empalme de ARN (Sm1 y Sm2, *del inglés: splicing motif*), un sitio hipotético de reconocimiento de la caspasa 3, una señal de distribución mediada por clatrina y de exportación al Retículo Endoplasmático (Figura No.1) (Affaitati et al., 2001; Huynh et al., 2003; Albrecht et al., 2004; Riverón, 2008).

Además de la forma completa de esta proteína, han sido caracterizadas otras tres variantes que se originan debido al empalme alternativo del ARN mensajero, identificadas en ratones y sobre las que se ha especulado que podrían desempeñar diferentes funciones fisiológicas en determinados tejidos (Nechiporuk et al., 1998; Affaitati et al., 2001) (Anexo No.2).

Mediante análisis de la secuencia aminoacídica se ha demostrado que la ataxina-2 pudiera interactuar con proteínas de unión a poliadenina (PABP, *del inglés: polyadenosine binding proteins*) (Satterfield y Pallanck, 2006; Nonhoff et al., 2007). Se ha sugerido que ésta participa en rutas celulares ligadas al procesamiento de ARN y a la regulación traduccional, debido a que también interactúa con una proteína citoplasmática de unión a ARN -A2BP, *por sus siglas en inglés-* y que se ensambla físicamente a los polirribosomas, (Shibata et al., 2000; Ralser et al., 2005; Satterfield y Pallanck, 2006).

El gen *Atxn2* humano muestra una expresión ubicua: encéfalo, corazón, placenta, hígado, músculo esquelético y páncreas (Pulst et al., 1996; Lastres-becker et al., 2008). También en el ratón *Mus musculus* (Nechiporuk et al., 1998), la mosca *Drosophila melanogaster* (Satterfield et al., 2002) y el gusano *Caenorhabditis elegans* (Kiehl et al., 2000; Ciosk et al., 2004), el gen es expresado en la mayoría de los tejidos examinados (Aguar et al., 2006); en este último caso fue observada una fuerte expresión en tejido muscular, nervioso y embrionario.

Los mayores niveles de ataxina-2 han sido detectados en el epéndimo y el plexo coroideo, niveles altos en las células de Purkinje cerebelosas, neuronas grandes de la sustancia nigra además del núcleo troclear y un marcaje moderado, en el citoplasma apical de neuronas del hipocampo, pirámides corticales, núcleo de la oliva, colículo inferior, globo pálido y amígdala. El nivel de ataxina-2 en las células de Purkinje aumenta con la edad y el marcaje es más intenso en individuos con SCA2 en comparación con individuos normales (Huynh et al., 1999).

El análisis del patrón de expresión de la ATXN2 en embriones evidenció la presencia de esta proteína en la mayoría de los tejidos, con niveles particularmente altos en el tejido nervioso central (Satterfield et al., 2002). Resulta interesante que el efecto nocivo de su forma mutada se limita a determinadas áreas, fundamentalmente células de Purkinje en la corteza del paleo y neocerebelo, y neuronas de la oliva inferior en el tallo cerebral (Rub et al., 2003; Ying et al., 2006; Lastres-becker et al., 2008), lo que sugiere la existencia de mecanismos que confieren una parcial protección en zonas específicas del sistema nervioso a pesar de expresar también la proteína mutante (Viscomi et al., 2005).

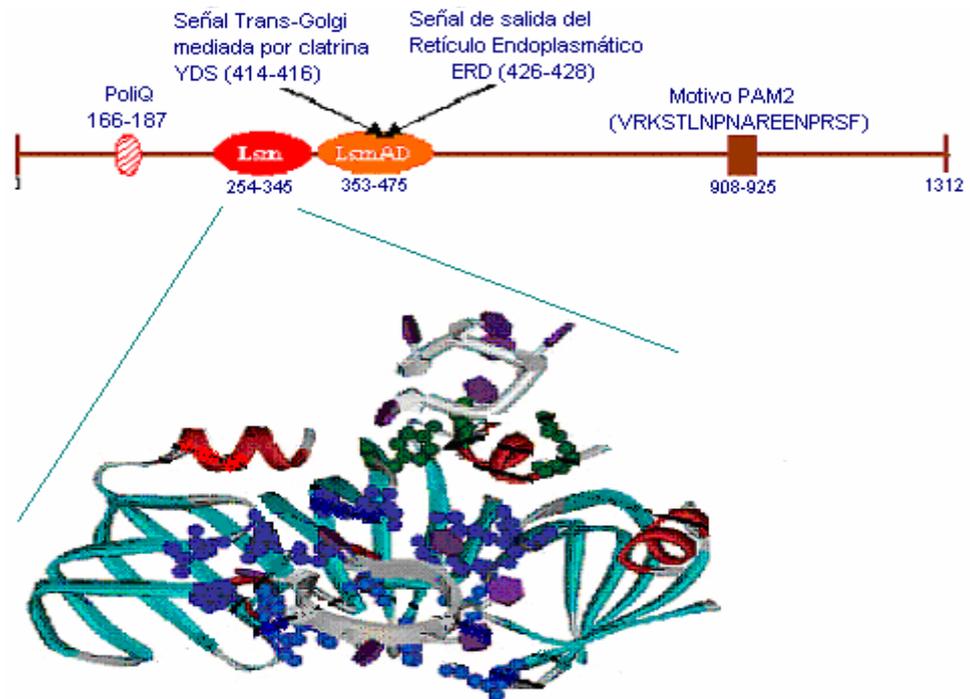


Figura No.1. Representación esquemática de las principales características estructurales de la ataxina-2, y modelo tridimensional del dominio Lsm. El modelo ilustra los sitios interno y externo predichos de unión de la ataxina-2 a ARN. Las hélices- α son mostradas en rojo, y las cadenas- β en verde-azul. Los cuadros azul oscuro representan residuos que forman el sitio interno, los cuadros azul claro muestran aminoácidos que estabilizan el área de unión a ARN, los cuadros verde oscuro representan residuos que forman el sitio externo, y los cuadros verde claro representan residuos que estabilizan a los puentes de hidrógeno (Adaptado de Albrecht et al., 2004).

II.2. Metilación del ADN y su contribución a la SCA2.

La Epigenética comprende el estudio de los cambios hereditarios en patrones de expresión génica que están mediados por mecanismos diferentes a las modificaciones de la secuencia nucleotídica primaria de un gen. Se encuentran incluidos dentro de estos mecanismos la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y la estructura tridimensional de la cromatina (Klose y Bird, 2006; Hirst y Marra, 2009)

II.2.1. Metilación y expresión génica.

La metilación al ADN es la principal modificación epigenética del genoma y regula aspectos fundamentales de este. Su papel biológico en el funcionamiento celular es controversial si se analiza su participación en procesos tales como la diferenciación, regulación de la expresión génica tejido específico, inactivación del cromosoma X en la mujer, impronta genómica, mantenimiento de la estructura cromosómica e incluso el propio envejecimiento (Grace y Bestor, 2005).

El proceso de metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo en el carbono 5 del anillo citosínico del dinucleótido citosina-guanina (C:G) (Santos y Dean, 2004; Hirst y Marra, 2009). Esta reacción, en la que se utiliza como sustrato SAM (*del inglés: S-adenosylmethionine*) y que ocurre una vez concluido el proceso de replicación, es catalizada por un grupo conservado de enzimas denominadas (DNMTs: *DNA methyltransferases*) (Figura No.2) (Derks et al., 2004).

La formación del patrón de metilación ocurre durante el desarrollo embrionario entre la primera y segunda división celular, iniciándose después de la fertilización con un proceso de eliminación de los grupos metilos presentes en el genoma de los gametos (Santos y Dean, 2004; Rousseaux et al., 2005; Morgan et al., 2005), exceptuando los de la «impronta» parental que se conservan (González et al., 2008). La pérdida de la metilación se extiende progresivamente a través del tiempo hasta culminar aproximadamente en el momento de implantación del blastocito (Santos y Dean, 2004).

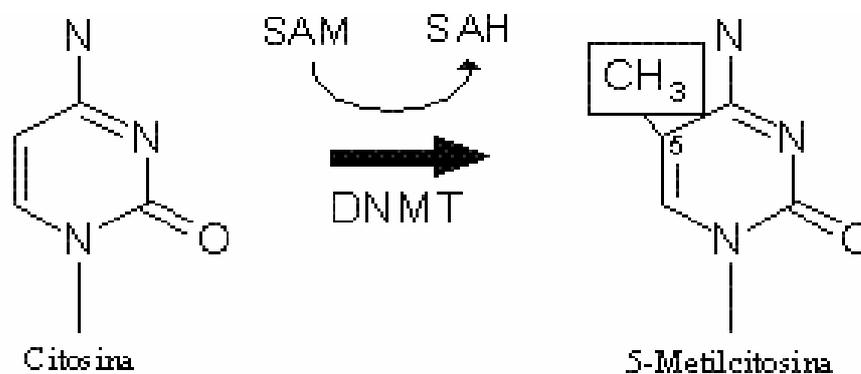


Figura No.2. Reacción de metilación de la citosina. La figura muestra de forma esquemática la metilación del anillo de la citosina en la posición cinco mediante la acción catalítica de las DNMT, del inglés: DNA methyltransferase. En esta el sustrato SAM (S-adenosylmethionine) actúa como un donador del grupo metilo y es transformado a SAH, del inglés: S-adenosylhomocysteine.

Después de la implantación, durante los procesos de diferenciación celular, el genoma de los tejidos embrionarios se metila siguiendo perfiles de metilación específicos que definen las características de los nuevos tejidos (Santos y Dean, 2004; González et al., 2008). Tales modificaciones se transmiten de las células madres a las células hijas. Como resultado, cada tipo celular tiene su propio patrón epigenético que es sostenido para conservar la función de los genes (Santos y Dean, 2004; Whitelaw y Whitelaw, 2006; Keverne y Curley, 2008).

La herencia somática de los patrones de metilación en los mamíferos ha sido confirmada en varias investigaciones. Wigler y otros científicos observaron por ejemplo, que patrones arbitrarios de metilación de la citosina impuestos a través del uso de plásmidos se mantenían de forma estable cuando estos se integraban dentro del genoma de las células estudiadas. Demostraron además que, en sistemas controlados por el efecto del número de copias y sitios de integración, los patrones de metilación se mantienen esencialmente sin sufrir cambios por 80 divisiones celulares (Wigler et al., 1981).

Los mamíferos presentan en estado no metilado la mayoría de los islotes de CpG - fragmentos de ADN de longitud oscilante entre 0,4 a 3 Kb, con un contenido de C:G mayor de un 55 % y una frecuencia observada mayor a 0.65 (Grace y Bestor, 2005; Vaissiere et al., 2008).

Los islotes CpG contienen aproximadamente el 20 % de todos los dinucleótidos C:G del genoma y están asociados con el 76 % de las regiones promotoras de todos los genes humanos (Herman y Baylin, 2003; Grace y Bestor, 2005), muchos de los cuales son silenciados durante el desarrollo hasta alcanzar la vida adulta. Esto incluye, además de los genes estrictamente necesarios para el desarrollo embrionario, aquellos que son gradualmente apagados durante el proceso de envejecimiento (Martin, 2007; Irminger-Finger, 2007).

Dada la elevada implicación de la metilación en el adecuado funcionamiento celular (Rodenhiser y Mann, 2006), las células presentan una marcada reducción de su capacidad para producir metilación *de novo* en las secuencias promotoras de sus genes, mientras que mantienen la capacidad para modificar la metilación de sitios distales (Carotti et al., 1998).

La metilación *de novo* resulta presumiblemente, de una interacción entre la metiltransferasa y un elemento propio de la secuencia. Un alto contenido de GC, además de la formación de estructuras secundarias inusuales en el ADN, pudieran actuar como moduladores de la metilación (Turker, 1999; Buryanov y Shevchuk, 2005). Ha sido observado también, un incremento de la metilación en áreas del genoma caracterizadas por la presencia de secuencias repetidas de nucleótidos y en regiones contiguas a las mismas (Bird, 2002).

La iniciación de la metilación *de novo* se asocia en gran medida con la actividad de la enzima DNMT3 que, a diferencia de la DNMT1, no muestra preferencia por la metilación de los sitios C:G hemimetilados, es decir metilados en la cadena molde y no metilados en la cadena nueva sintetizada complementariamente (Swales y Spears, 2005; Grace y Bestor, 2005).

La DNMT1 posee una débil capacidad para producir metilación *de novo*, que aumenta significativamente a medida que la molécula de ADN es forzada a adoptar una estructura secundaria (Smith et al., 1991; Grace y Bestor, 2005).

II.2.2. Metilación alelo-específica en el gen *Atxn2* y fenotipo de la SCA2.

La metilación de las secuencias promotoras de algunos genes constituye una fuente de diferenciación entre individuos de una misma especie y forma parte de los mecanismos que regulan la aparición de enfermedades infecciosas u otras como el cáncer (Robertson et al., 2006; Fleming et al., 2008). Esta podría ser además la causa de la variabilidad en el fenotipo clínico de algunas enfermedades neurodegenerativas (Nelson et al., 2008).

En el contexto de la SCA2, la hipótesis de la asociación entre la metilación del promotor del gen *Atxn2* y la variabilidad fenotípica de la enfermedad, se fundamenta en el hecho de que la región promotora está parcialmente situada dentro de la secuencia del exón 1, donde se localizan las expansiones del trinucleótido CAG, además de la presencia de varios islotes CpG a ambos lados del sitio de inicio de la transcripción (Nechiporuk et al., 1998; Aguiar et al., 1999; Sobczak y Krzyzosiak, 2005).

En la SCA2, al igual que otras enfermedades neurodegenerativas, la pérdida de las interrupciones del triplete CAA produce desestabilización de la replicación,

alargamiento de la secuencia repetitiva de CAG y consecuentemente la formación de estructuras secundarias no convencionales como las horquillas (Sobczak y Krzyzosiak, 2004; 2005).

La presencia de horquillas y el alto contenido de C:G probablemente atraigan y actúen como activadores de las enzimas metiltransferasas, desencadenándose de esta manera la metilación *de novo* alelo específica sobre los islotes CpG del promotor del gen *Atxn2*.

II.2.3. Métodos analíticos para el estudio de la Metilación.

El análisis de la expresión génica es considerado un recurso importante de información biológica con potencial utilidad clínica. Sin embargo, la obtención de ARN con alta calidad, en la cantidad requerida para los estudios y la inestabilidad de estas macromoléculas, pudieran constituir serias limitantes.

El patrón de metilación de los sitios CpG en el ADN brinda una estrategia alternativa si se considera que este refleja, al menos en parte, el perfil de la expresión génica de las células. Aunque se ha venido incrementando su empleo, su generalización ha sido limitada debido a que los patrones de metilación no son retenidos durante la amplificación que tiene lugar en la mayoría de las técnicas de biología molecular, incluidas la PCR y la amplificación de señales utilizando sondas de hibridación (Brena et al., 2006; Zilberman y Henikoff, 2007).

La primera generación de los métodos analíticos para el estudio de los patrones de metilación, empleó la digestión del ADN genómico por medio de enzimas de restricción con actividad sensible a metilación y Southern blot o PCR (Azhikina y Sverdlov, 2005). Aunque estas técnicas son relativamente sencillas, problemas como la disponibilidad restringida de los sitios de restricción o los falsos positivos debido a la incompleta digestión, han limitado su explotación.

Una segunda generación de técnicas surgió como resultado de haberse demostrado que el tratamiento del ADN genómico con bisulfito de sodio en un medio alcalino convierte las citosinas no metiladas en uracilo, mientras que las metilcitosinas permanecen estructuralmente invariables (Figura No.3) (Hayatsu et al., 2007).

La transformación de las citosinas no metiladas a uracilo, incluyendo aquellas no presentes en el dinucleótido CpG, hace que las cadenas de ADN pierdan su complementariedad (Tusnady et al., 2005). Este hecho, constituye además la base para establecer los patrones de metilación del ADN en su estado natural mediante el empleo de diversas metodologías en las que la PCR constituye el método de amplificación (Callinan y Feinberg, 2006).

El uso de la PCR con oligonucleótidos o cebadores complementarios a las secuencias nucleotídicas de ADN modificado con bisulfito de sodio, para identificar los patrones de metilación de un locus particular, se le conoce como MSP (*del inglés: methyl-specific PCR*) (Derks et al., 2004). La MSP sólo comprende el estudio de una de las cadenas de ADN, partiendo del hecho de la no complementariedad entre estas post-modificación y del comportamiento palindrómico de las secuencias de CpG (Trinh et al., 2001).

Desde el punto de vista práctico, el estudio de la metilación es el resultado de reacciones simultáneas de PCR en las que se emplean cebadores capaces de reconocer la secuencia de interés, tanto en la versión metilada (MP) como la no metilada (UP) (Li, 2007).

El establecimiento del estado de metilación de los dinucleótidos CpG existentes dentro de la secuencia nucleotídica de reconocimiento de ambas parejas de cebadores (MP, UP), puede efectuarse mediante el uso de técnicas tanto cualitativas como cuantitativas: ej. Electroforesis en gel de agarosa y PCR en tiempo real, respectivamente. En el caso cualitativo, si los CpG de una secuencia molde objeto de estudio no hubieran estado metilados antes de la modificación y se realizara la PCR con oligonucleótidos diseñados sin considerar la transformación de las citosinas de los sitios CpG, es decir con cebadores MP, no se detectara señal en el gel de agarosa, en el caso contrario se observará una banda (Figura No. 3)

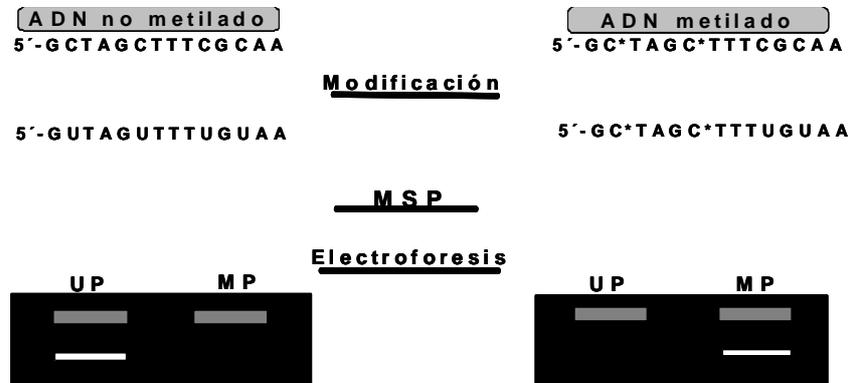


Figura No.3. Secuencia de trabajo para el análisis del estado de metilación de las regiones promotoras. En la figura se ilustra las diferentes etapas que enmarcan el análisis de metilación y los posibles resultados obtenidos dependiendo del estado de metilación original de la secuencia de estudio. Las bandas en gris representan el punto de aplicación de las mezclas de reacción una vez concluida la MSP y las de color blanco representan el producto específico obtenido como resultado de la amplificación durante la MSP. C*: citosina metilada; **MSP**, del inglés: *Methyl specific PCR*, **UP**, del inglés: *unmethylated primer* (oligonucleótido de secuencia complementaria al ADN modificado y no metilado antes del tratamiento con bisulfito de sodio); **MP**, del inglés: *methylated primer* (oligonucleótido de secuencia complementaria al ADN modificado y metilado antes del tratamiento con bisulfito de sodio).

III. PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS.

III.1. Metodología experimental.

III.1.1. Selección de la muestra a estudiar.

En la Clínica para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias (CIRAH), desde 1990 ha sido archivada información clínica, genealógica y/o molecular correspondiente a 2 305 individuos pertenecientes a 101 familias holguineras con ataxia espinocerebelosa tipo 2. Toda esta información se encuentra almacenada en bases de datos especializadas.

Adicionalmente, contamos con muestras de ADN correspondientes a 2 305 individuos pertenecientes a estas familias, dentro de las que se incluyen 616 personas clínicamente enfermas, 1 623 descendientes en riesgo y 66 esposos (as) no relacionados, lo que representa el banco de ADN de familias con ataxia espinocerebelosa tipo 2 más amplio del mundo.

A partir de estos resultados fueron seleccionados al azar sujetos que cumplían con los siguientes criterios:

Grupo 1 (Pacientes): Individuos con diagnóstico clínico y molecular de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

Grupo 2 (controles): Individuos clínicamente sanos y no portadores del gen *Atxn2* (sujetos sanos).

III.1.2. Ética de la investigación.

En todos los casos se respetó la autonomía de las personas, incluyendo en el estudio solamente aquellas que dieron su consentimiento para participar en el mismo (Anexo No.3). Fueron tomadas todas las medidas necesarias y suficientes para la protección de los individuos objeto de investigación. La identidad de los resultados estuvo sujeta a estrictas normas de confidencialidad y sólo pudo ser manejada por los profesionales que participaron en la investigación. No podrán ser publicados datos que puedan conducir a la identificación de los enfermos.

III.2. Métodos analíticos y bioinformáticos utilizados.

III.2.1. Aislamiento de ADN.

El ADN fue aislado a partir de leucocitos de sangre periférica (10 mL) usando el método Nucleon II (Gentra System) y siguiendo las indicaciones establecidas por sus diseñadores (Kunkel et al., 1977).

III.2.2. Determinación de la concentración del ADN.

El ADN obtenido por el método Nucleon II b fue hidratado en 35 µL de Buffer Tris-EDTA e incubado a 37°C durante 15 minutos y pH neutro. Tomando alícuotas de 4 µL de la solución homogénea obtenida, se prepararon 3 diluciones de la misma muestra (volumen final 0.2 mL) en las que fue determinado la concentración de ADN por espectrofotometría. El grado de pureza del ADN aislado fue determinado usando la relación de absorbancias 260/280 nm.

Las lecturas de la absorbancia fueron realizadas en el espectrofotómetro ThermoSpectronic (Merck) usando cubetas certificadas de Sílice para UV lejano (VWR INTERNATIONAL LTD). La concentración de ADN fue calculada mediante la ecuación:

$$C_{ADN} = [(A_1 - A_{ref}) f_1 - (A_2 - A_{ref}) f_2] D_f$$

Donde A_1 : absorbancia a 260 nm. f_1 : 62.9 D_f : factor de dilución.

A_2 : absorbancia a 280 nm. f_2 : 36.0

III.2.3. Modificación del ADN genómico.

La modificación del ADN consistió en la conversión química de todas las citosinas no metiladas a uracilos. La reacción de modificación fue realizada con bisulfito de sodio mediante el uso del kit CpGenome™ ADN (cat. #S7820, Chemicon, CA., USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -80°C para su uso posterior.

III.2.4. Análisis y Predicción de la región promotora del gen Atxn2.

El análisis y predicción de la región promotora del gen *Atxn2* se realizó mediante el método descrito [Prestridge \(1995\)](#), con el empleo del programa ProScan™, disponible en el sitio web:

<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/index.html>.

El algoritmo de este programa para localizar las posibles secuencias promotoras consiste en la comparación de la secuencia genómica investigada y los motivos de secuencias reconocidos por la Pol II de primates, incluidos en la base de datos de factores de transcripción Ghosh y Transfac.

La secuencia del gen *Atxn2* fue descargada de la base de datos NCBI, con número de acceso NG_011572.1 del GenBank.

III.2.5. Análisis y Predicción del islote de CpG.

La predicción del islote de CpG de la región promotora del gen *Atxn2* fue realizado usando el programa MethPrimer™ ([Li y Dahiya, 2002](#)), disponible en el sitio web:

<http://www.itsa.ucsf.edu/urolab/methprimer/>.

Para ello, se hizo la solicitud usando los criterios estándares que establecen que una zona genómica puede ser considerada como islote de CpG cuando el porcentaje de G+C es superior a 50 y la razón entre el número de CpG observado y el esperado teóricamente es mayor que 0.6 -CpG obs/esp > 0.6- ([Derks et al., 2004](#)).

Para predecir los islotes CpG, se descargó de la base de datos NCBI la secuencia íntegra del gen *Atxn2*, con número de acceso NG_011572.1 del GenBank. Posteriormente se recuperó el gráfico y se analizó la secuencia.

Teniendo en cuenta que la región comprendida entre los nucleótidos 1- 436 contiene el sitio de inicio de la transcripción, diversos módulos de unión a factores de transcripción y que previamente se determinó su papel como región promotora ([Aguiar et al., 1999](#)), el análisis se centró en esta secuencia. La determinación de la frecuencia y densidad de CpG fue desarrollada de forma manual ([Anexo No.4](#)).

III.2.6. Predicción de sitios sensibles a metilación.

Para predecir las citosinas sensibles a metilación en los dinucleótidos CpG de la región promotora del gen *Atxn2*, fue usado el programa bioinformático SVM (*del inglés: Support Vector Machine*) disponible en el sitio web: <http://bio.dfci.harvard.edu/Methylator/> (Bhasin et al., 2005).

Este programa permite al usuario preestablecer el umbral de especificidad y sensibilidad. En el presente trabajo las secuencias genómicas fueron analizadas bajo un umbral del 84.3% de especificidad y sensibilidad.

III.2.7. Diseño de oligonucleótidos para PCR sensible a metilación (MSP).

En específico, para el gen *Atxn2* los oligonucleótidos fueron diseñados fijando parámetros estándares y usando el programa MethPrimer, disponible en el sitio web: <http://www.itsa.ucsf.edu/urolab/methprimer/> (Li y Dahiya, 2002).

Basándose en la extensión de la isla de CpG del gen, el programa generó cebadores superpuestos que amplifican sólo las 2/3 partes de dicho islote. Esta región incluye la secuencia promotora y otros motivos de unión de factores de transcripción (TF, *del inglés: transcription factor*)

El análisis y comparación de las secuencias de los oligonucleótidos que amplifican la región en sus tres versiones, metilada, no metilada y ADN genómico, fue realizado manualmente por dos grupos de experimentadores de forma independiente. Posterior a su diseño, los cebadores fueron fabricados por Operon Molecule for life (GmbH) y Tib-MolBiol, resuspendidos en Buffer Tris-HCl, EDTA, pH 7 y almacenados a -20°C.

III.2.7.1. Determinación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos.

La temperatura de alineamiento fue calculada a través del empleo de la ecuación matemática que a continuación se muestra.

$$T_m = 2\text{ °C (A + T)} + 4\text{ °C (G + C)}$$

- A: Número de adeninas presente en la secuencia del oligonucleótido.
- T: Número de timinas presente en la secuencia del oligonucleótido.
- G: Número de guaninas presente en la secuencia del oligonucleótido.
- C: Número de citosinas presente en la secuencia del oligonucleótido.

- T_m: Temperatura de alineamiento.

III.2.8. Estandarización de la técnica MSP.

La MSP se llevó a cabo mediante el empleo de oligonucleótidos diseñados al efecto y usando un termociclador eppendorf (GmbH). Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% de concentración, a 99 V por 20 minutos en buffer tris - ácido bórico 0.5 X (buffer TB). Posteriormente, los geles fueron incubados en una solución de 5 mg/mL de bromuro de etidio por 5 minutos, visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados utilizando una cámara KodaK DC290.

Se establecieron las condiciones estándares para el mapeo del patrón de metilación del gen *Atxn2* a través del método de prueba y error. Con este propósito se realizaron varias MSP a diferentes gradientes de temperatura de unión (T_m), concentraciones de MgCl₂; así como se variaron otros factores que influyen directamente en la técnica, tales como la concentración de ADN modificado, de desoxirribonucleótidos (dNTP), de la enzima Taq-ADN polimerasa y el número de ciclos térmicos.

Se seleccionó la mejor combinación de factores tecnológicos de acuerdo a la discriminación entre señal de fondo y señal específica. Como control de la técnica se usó ADN no metilado e hipermetilado comercializado por la firma Chemicon, Temecula. CA y Qiagen.

La especificidad del método se estableció mediante el empleo de marcadores de peso molecular comercializado por la firma Roche y la realización de una MSP anidada (nested-MSP, *por su siglas en inglés*), así como verificando la existencia o no de alineamientos inespecíficos de los oligonucleótidos diseñados. La sensibilidad se determinó mediante el método de diluciones seriadas, usando los controles comerciales no metilados e hipermetilados.

III.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó comparando las frecuencias porcentuales a través del test de Chi cuadrado con diferentes niveles de significación $p < 0,05$ -significativo-, $p < 0,01$ -muy significativo- y $p < 0,001$ -altamente significativo-.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1. Estructura del gen *Atxn2*.

El gen *Atxn2* fue identificado en 1996 por tres grupos de científicos (Imbert et al., 1996; Pulst et al., 1996; Sanpei et al., 1996); a partir de entonces algunos investigadores han contribuido a la caracterización estructural del mismo. En ese sentido se destaca el trabajo de Aguiar y colaboradores (1999) que, mediante el clonaje de varios fragmentos de la región 5', identificaron el promotor fisiológico del gen *Atxn2*.

La secuencia nucleotídica propuesta como región promotora por Aguiar y colaboradores (1999), enmarca 798 pb entre el sitio de restricción de la enzima KPNI, localizado a 436 pb cadena abajo del inicio del gen, hasta el sitio de restricción de la enzima SACL, situado cadena arriba a 362 pb del inicio del mismo. Aguiar y colaboradores (1999) reportaron además que la región 5' del gen se encuentra incluida en un islote de CpG típico, y es interesante que la secuencia propuesta como promotor se extiende hasta el interior de la región comprendida por el exón 1, con la distribución de cuatro cajas GC cadena arriba y otras cuatro cajas GC cadena abajo a partir del sitio hipotético de iniciación de la transcripción -ATG-. Cadena abajo del sitio de restricción para la enzima SACL, además de las mencionadas, existen cuatro cajas GC y cadena arriba, un ATG en el marco de lectura a 12 pares de bases de la secuencia de CAG en el exón 1 del gen.

En la presente investigación el gen *Atxn2* fue analizado estructuralmente con el empleo de una herramienta bioinformática, es decir, *in silico* mediante el programa ProScan, que preestablece un valor de corte de 53.00 unidades correspondientes a una especificidad del 70% y realiza un barrido hasta encontrar la secuencia con mayor valor de especificidad en la señal. Este valor umbral determina una tasa de falsos positivos de 1/5600 bases (Prestridge et al., 1995).

El análisis del gen *Atxn2* para la identificación de la secuencia promotora, mostró una corta región de aproximadamente 250 pb con una señal altamente específica (169.25) comparado con el valor de corte preestablecido por el programa (Tabla No.1). La alta especificidad de la actual predicción, unido a los elevados niveles de expresión encontrados por Aguiar y colaboradores en células de teratocarcinoma

-F9- y de Neuroblastoma -SH-SY5Y- usando fragmentos que incluían parcialmente a la región, hacen de la secuencia promotora propuesta una fuerte candidata a núcleo del promotor del gen *Atxn2* (Aguiar et al., 1999).

Es interesante que esta región núcleo del promotor (“promoter core”) se encuentra entre los nucleótidos 230 y 471 del extremo 5’ no traducible (UTR 5’, *del inglés: untranslated region*) del gen *Atxn2*, e incluye el sitio de restricción para la enzima SACL (Figura No.4), usada en el clonaje del promotor (Aguiar et al., 1999). Estos resultados revelan que en la región promotora propuesta por Aguiar y colaboradores excluía 109 pb que pudieran tener un importante papel en la función del promotor.

El núcleo identificado del promotor, se sitúa a 68 pb cadena arriba del primer sitio de inicio de la transcripción en marco (ATG) y a 171pb del sitio alternativo de inicio de la transcripción, situado a 12 pb de la secuencia repetitiva del triplete CAG en el exón 1 del gen *Atxn2*; ambos descritos en el estudio de Aguiar y colaboradores (1999).

El estudio *in silico*, además demostró que el núcleo del promotor presenta motivos de unión para el factor de transcripción *Sp1* (Tabla No.2), que desempeña un papel importante en la diferenciación, proliferación, así como control de la apoptosis celular y para el cual se ha demostrado su capacidad de interacción con proteínas poliglutaminadas (Ryu et al., 2003).

Fue observado en el estudio de la estructura del gen además, una alta cantidad de dinucleótidos CpG que en su versión metilada son diana del factor de transcripción MECP2 (*del inglés: methyl-CpG binding protein 2*). Este factor transcripcional, actúa como represor de la expresión debido a su unión a dinucleótidos CpG metilados situados a nivel de promotor y al reclutamiento de diversos correpresores, así como proteínas que participan en la remodelación de la cromatina (D’Esposito et al., 1996; Nan et al., 1998; Kishi y Macklis, 2005).

Tabla No.1. Predicción de la región núcleo del promotor del gen *Atxn2*.

Factor de Transcripción	TFD #	Sentido de la Cadena	Localización	Especificidad
HC5	S00245	-	426	1,012
T-Ag	S00974	+	281	1,086
AP-2	S01936	-	284	1,091
AP-2	S01936	+	323	1,108
AP-2	S01936	+	463	1,108
UCE.2	S00437	-	263	1,216
UCE.2	S00437	-	340	1,216
UCE.2	S00437	-	428	1,216
UCE.2	S00437	+	260	1,278
AP-2	S00346	+	327	1,355
JCV_repeated_sequenc	S01193	+	277	1,427
JCV_repeated_sequenc	S01193	-	330	1,658
JCV_repeated_sequenc	S01193	-	470	1,658
AP-2	S00346	-	287	1,672
c-fos.5	S00675	-	249	1,912
H4TF1	S01969	-	332	2,099
GCF	S01964	-	419	2,284
GCF	S01964	+	265	2,361
GCF	S01964	+	413	2,361
Sp1	S00801	+	330	2,755
Sp1	S00801	+	464	2,755
Sp1	S00781	-	335	2,772
Sp1	S00781	-	469	2,772
Sp1	S00978	+	277	3,013
Sp1	S00802	-	282	3,061
Sp1	S00801	-	283	3,119
Sp1	S00801	-	459	3,119
Sp1	S00781	+	278	3,191
Sp1	S00781	+	454	3,191
Sp1	S00802	+	320	3,292
Sp1	S00802	+	465	3,292
Sp1	S00978	-	325	3,361
Sp1	S00978	-	470	3,361
TTR_inverted_repeat	S01112	-	272	3,442
Sp1	S00953	-	285	5,737
EARLY-SEQ1	S01081	-	284	5,795
Sp1	S00979	-	471	6,023
EARLY-SEQ1	S01081	+	329	6,322
EARLY-SEQ1	S01081	+	463	6,322
(Sp1)	S01187	-	284	6,819
APRT-mouse_US	S00216	-	285	7,604
(Sp1)	S01187	+	329	8,117
(Sp1)	S01187	+	463	8,117
Sp1	S01189	+	280	34,423

Posición relativa: 230-471nt. Programa: ProScan.

Especificidad de la predicción: 169.25 (Valor de Corte= 53,00)

TFD: Identidad del factor de transcripción.

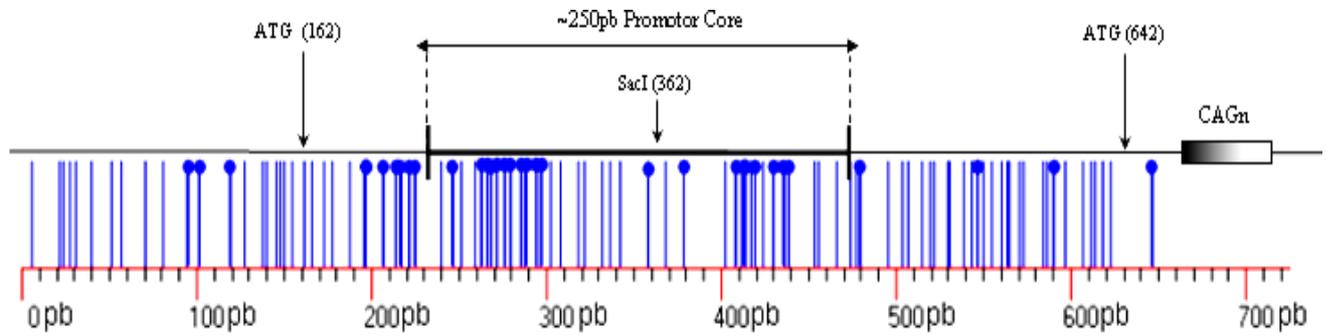


Figura No.4. Predicción de los sitios metilables de la región 5'UTR del gen *Atxn2*. Las barras representan los CpG, las barras con bolas dinucleótidos CpG metilables.

A partir del análisis de los resultados obtenidos ([Tabla No.2](#)), otros factores de transcripción que pudieran reconocer secuencias en esta región son los pertenecientes a la familia AP-1 y AP-2 (*del inglés: activator protein 1 and 2*). Estos constituyen un grupo de proteínas diméricas básicas con motivos de zipper de leucina (bZIP) que pertenecen a las sub-familias de Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K y Nrl) y ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) ([Shaulian y Karin, 2002](#)). El factor transcripcional AP-1, *del inglés: activator protein-1*, se ha visto involucrado en procesos de proliferación, transformación y muerte celular ([Shaulian y Karin, 2002](#); [Hess et al., 2004](#)).

Los elementos de secuencia reconocidos por los factores de transcripción identificados en el estudio ([Tabla No.2](#)), tienen en común cadenas con alto contenido de CpG y su unión a estas secuencias es modulada por el estado de metilación.

La presencia de 4 cajas GC en la región núcleo del promotor *Atxn2*, sugiere por tanto que la síntesis del transcrito pudiera depender de un lazo de retroalimentación en la que participaría Sp1 y otros factores que reconocen este tipo de secuencia, así como del estado de metilación de las cajas GC presentes en el gen *Atxn2*; lo que al parecer es necesario para una adecuada homeostasis celular.

La pérdida total de la metilación en el promotor del gen *Atxn2*, probablemente produzca sobre-expresión de este y la exacerbación del cuadro neurológico en pacientes. Haber demostrado que Sp1, un importante regulador de la apoptosis y la proliferación celular, constituye el principal factor transcripcional con sitio de reconocimiento en el promotor, así como el hecho de que la sobre-expresión de ataxina-2 normal y no de ataxina-2 mutada induce apoptosis celular en células de neuroblastoma ([Wiedemeyer et al., 2003](#)), fortalecen la hipótesis.

Tabla No. 2. Factores de transcripción representativos que reconocen secuencias en la región nuclear del promotor *Atxn2*.

TF	Motivo	Cadena	Especificidad
<i>Sp1-SV40.4</i>	GGGCGG	+	34.423.000
<i>(Sp1)-TK.1</i>	CCCCGCCC	+	8.117.000
<i>APRT-mouse_US</i>	GCCCCGCC	-	7.604.000
<i>EARLY-SEQ1</i>	YYCCGCCC	+	6.322.000
<i>TTR_inverted_repeat</i>	CGCCGCG	-	3.442.000
<i>GCF</i>	SCGSSSC	-	2.284.000
<i>H4TF1</i>	GGCCG	-	2.099.000
<i>c-fos.5</i>	GCGCCACC	-	1.912.000
<i>AP-2</i>	YCSCCMNSSS	-	1.672.000
<i>JCV_repeated_sequenc</i>	GGGNGGRR	-	1.658.000
<i>UCE.2</i>	GGCCG	+	1.278.000
<i>T-Ag</i>	GGGGC	+	1.086.000
<i>HC5</i>	CCGAAAC	-	1.012.000

Otra evidencia que apoya la hipótesis de la relación entre el estado de metilación y el cuadro clínico neurológico en los pacientes, radica en que el aumento de la concentración de ataxina-2, tanto en su forma normal como mutada, produce el secuestro de la proteína DDX6 (del inglés: DEAD/H-box RNA helicase) que forma parte de los gránulos de estrés y de los cuerpos P (Nonhoff et al., 2007).

El aumento de la concentración de ataxina-2, tanto en su forma normal como mutada, además inhibe el ensamblaje de los gránulos de stress y los cuerpos P (Nonhoff et al., 2007); dominios citoplasmáticos con un papel importante en el control de la degradación, estabilidad y traducción de los ARN mensajeros (Kedersha y Anderson, 2000).

El análisis de la secuencia del gen *Atxn2*, por otro lado, arrojó un alto contenido de dinucleótidos CpG que se distribuyen en 5 grandes islotes. Notablemente, el primero de estos se extiende desde la región 5' no traducible (5'UTR) hasta el primer intrón del gen. Esta 5'UTR se encuentra embebida en un típico islote de CpG que enmarca 100 unidades del dinucleótido desde el inicio del gen hasta el sitio donde se repite el codón CAG; es decir, en unas 650 pb aproximadamente (Figura No.5). Lo anterior es una característica típica de promotores TATA⁻/Inr⁻ localizados en genes que se expresan ubicuamente en el organismo y por esa razón son denominados, “genes houseskeeping” (Farré et al., 2007; Hoelzer et al., 2008).

La presencia de los islotes CpG en toda la secuencia del gen *Atxn2*, el nivel relativamente elevado de CpG metilables (34%) con una significativa probabilidad de estar metilados (75%) (Tabla No.3) y en particular, la localización de la región núcleo del promotor entre los dos ATG a sólo 68 pb del sitio potencial de inicio de la transcripción, sugieren que la metilación de los CpG constituye un factor que participa de forma importante en la modulación de la expresión de las distintas isoformas de ataxina-2; incluidas las variantes más tóxicas de la proteína mutada. En la SCA2, producto de la secuencia repetitiva expandida de CAG cercana al ATG alternativo, se producen en el ADN estructuras secundarias no convencionales en forma de horquillas (Sobczak y Krzyzosiak, 2004; 2005) que pudieran desencadenar la metilación *de novo* alelo específica; fundamentalmente

sobre los islotes CpG del promotor de la variante mutada del gen *Atxn2*. Este mecanismo de protección debe ser superior en pacientes con largas expansiones donde la probabilidad de formación de horquillas es mucho mayor, sin embargo hallazgos recientes indican que el efecto nocivo de la ataxina-2 aumenta con el incremento de la secuencia repetitiva de CAG y que los dominios C-terminales son importantes en el efecto citotóxico de la proteína ([Hiushan et al., 2007](#)).

El desencadenamiento de mecanismos antagonistas a diferentes niveles (transcripcional -protección- y post-traducciona -citotoxicidad-) producto de una misma secuencia repetitiva expandida de CAG, probablemente defina la supervivencia celular dependiendo de la dirección en la que se halla desplazado el equilibrio. Es de esperar por tanto, que individuos con un mismo $(CAG)_n$, incluso en las variantes más extremas, difieran en la expresión clínica de la enfermedad. Resulta interesante en este sentido que hermanos gemelos monocigóticos difieren en la severidad y grado de progresión de la SCA2 ([Anderson et al., 2002](#)), lo que confirma la existencia de factores ajenos a la expansión de CAG con efecto modulador del fenotipo.

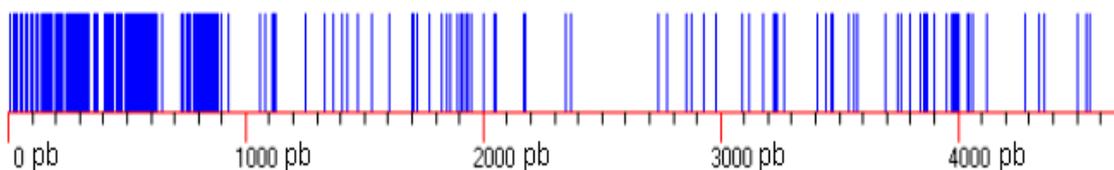


Figura No.5. Sitios CpG del *Atxn2* humano. Muestra una sobre representación de los sitios CpG en la región 5' del gen. Esta región incluye los primeros exones e intrones, así como la región promotora. Las barras azules representan los sitios CpG.

Tabla No.3. Potencial de metilación de la región 5'UTR del gen *Atxn2*.

Cantidad de CpG en la región: 100, sitios metilables: 33.

Lista de CpG y su localización en la secuencia genómica del gen *Atxn2*.

(1)	6	(2)	22	(3)	24	(4)	27
(5)	31	(6)	40	(7)	51	(8)	57
(9)	70	(10)	81	(11)	94	(12)	101
(13)	119	(14)	127	(15)	137	(16)	140
(17)	145	(18)	148	(19)	150	(20)	154
(21)	161	(22)	166	(23)	173	(24)	177
(25)	187	(26)	195	(27)	197	(28)	207
(29)	214	(30)	217	(31)	222	(32)	225
(33)	240	(34)	247	(35)	251	(36)	259
(37)	263	(38)	266	(39)	268	(40)	271
(41)	276	(42)	280	(43)	285	(44)	288
(45)	294	(46)	296	(47)	302	(48)	308
(49)	318	(50)	321	(51)	332	(52)	336
(53)	342	(54)	358	(55)	368	(56)	378
(57)	402	(58)	408	(59)	411	(60)	414
(61)	417	(62)	419	(63)	424	(64)	429
(65)	436	(66)	439	(67)	453	(68)	456
(69)	466	(70)	474	(71)	477	(72)	480
(73)	495	(74)	503	(75)	507	(76)	515
(77)	519	(78)	521	(79)	529	(80)	531
(81)	539	(82)	543	(83)	546	(84)	550
(85)	554	(86)	560	(87)	563	(88)	565
(89)	570	(90)	573	(91)	584	(92)	586
(93)	590	(94)	597	(95)	607	(96)	611
(97)	614	(98)	618	(99)	623	(100)	647

En *itálica*, *subrayado* y en *negritas* los sitios ATG. En *negritas* y *gris fuerte* los sitios metilables.

IV.2. Diseño de oligonucleótidos para estudiar la metilación mediante la MSP.

El éxito de la MSP está dado por un diseño correcto y eficiente de los oligonucleótidos. Para facilitararlo, el proceso se realiza mediante el uso de programas bioinformáticos que establecen la secuencia complementaria a la cadena de estudio, disponibles online en el sitio web: <http://www.urogene.org/methprimer/> (Li, 2007). A partir de ello, considerando tanto la transformación de citosina a uracilo, así como su permanencia invariable, se obtienen para ambas cadenas complementarias cebadores con capacidad de cubrir sitios de potencial metilación: dinucleótidos CpG- (Derks et al., 2004).

Durante el diseño de los cebadores deben considerarse diferentes criterios útiles para obtener un producto óptimo. Por ejemplo, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos debe ser similar y preferentemente debe oscilar entre los 55 y 65 °C, esto permite la realización simultánea de las reacciones, así como disminuir la variabilidad del ensayo (Wojdacz et al., 2008). Por otro lado, el producto de PCR debe contener entre 80 y 175 pb (Li y Dahiya, 2002).

Otro aspecto importante a considerar, son las características estructurales de los cebadores. Con el objetivo de garantizar especificidad durante la unión, es imprescindible que al menos cada cebador contenga 2 pares de CpG en su extremo 3' y que exista dentro de la secuencia nucleotídica citosinas no pertenecientes al dinucleótido CpG (Brandes et al., 2007; Wojdacz et al., 2008).

Tanto los cebadores MP como UP deben ser comparables en su secuencia y amplificar la misma región (Li y Dahiya, 2002). De esta manera permitirán reconocer en que estado estaba la secuencia original, es decir metilada o no metilada.

En el presente trabajo, con el propósito de caracterizar el grado de metilación de la región promotora del gen *Atxn2*, fue diseñado un grupo de oligonucleótidos superpuestos para la realización de la MSP; no mostrados por estar en vía de protección en la oficina de propiedad intelectual y por no haber sido autorizado por la administración a revelar su identidad.

El análisis general de estos mostró que cumplen con los requisitos necesarios y suficientes para el desarrollo de la técnica analítica. Por ejemplo, su tamaño osciló entre los 20 y 29 nucleótidos, lo que permite una alta especificidad de unión a la cadena complementaria. Por otro lado, el producto a amplificar tuvo un tamaño en pares de base que osciló entre las 147 y 152 unidades (Figura No. 6). (Li y Dahiya, 2002).

La pareja más importante de los oligonucleótidos diseñados para el análisis de metilación, incluye el oligonucleótido **F** (*del inglés forward*) (94nt-119nt) que se une a 70 pb del sitio de inicio de la transcripción y reconoce tres motivos CpG (Figura No. 6), además del oligonucleótido **R** (*del inglés reverse*) (220nt-240nt). Este último se alinea justamente en el inicio de la región nuclear del promotor e incluyen 3 motivos CpG en la cadena con sentido “sense” (Figura No. 6).

Las características estructurales de la secuencia nucleotídica amplificada, que comprende el sitio de inicio de la transcripción principal en el gen *Atxn2* (primer ATG) y la capacidad de reconocimiento de motivos CpG de los oligonucleótidos más informativos y por ello, considerados más importantes, hace de estos reactivos imprescindibles para discernir la participación de la metilación *de novo* en la patogénesis de la SCA2. La configuración en díada de una pareja de CpG alrededor del primer ATG, es decir **CGATGCG** (Figura No.6), sugiere que estos sitios son potenciales dianas para una regulación dinámica epigenética de la expresión de las isoformas de la ataxina-2 por el potente impedimento estérico que ejercerían en estado metilado, confirma además la alta trascendencia del uso de esta pareja de oligonucleótidos en futuras investigaciones.

Otra de las pruebas realizadas para demostrar la eficiencia de los cebadores diseñados antes de efectuar su síntesis química, fue el análisis matemático de la temperatura de alineamiento de cada uno de los oligonucleótidos (Tabla No.4). La comparación entre los cebadores MP y UP reveló, en el caso particular de los oligonucleótidos más útiles desde el punto de vista informativo, que entre las temperaturas de alineamiento estimadas existían diferencias, siendo más acentuadas (6 °C) para la variante **F** como resultado del mayor número de citosinas presentes en la secuencia del oligonucleótido MP (Tabla No.4).

Aunque en teoría la diferencia entre las temperaturas de alineamientos correspondientes a los oligonucleótidos podría constituir una limitante en el empleo de estos, dado que la diferencia es pequeña, en la práctica existe la posibilidad de realizar PCR simultáneas hasta alcanzar una temperatura óptima de alineamiento común para todos los cebadores. Ello, así como su alto poder informativo justifica la síntesis y explotación de estos.

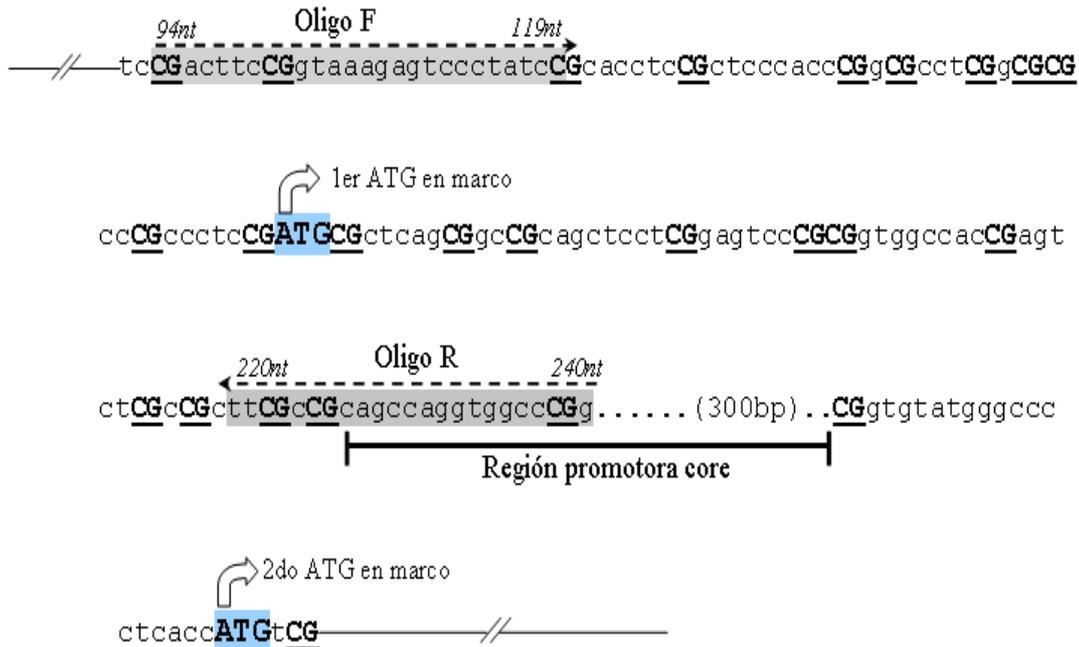


Figura No.6. Esquema representativo de la región promotora del gen *SCA2*. Muestra una alta frecuencia de sitios CpG cercanos a los 2 sitios de inicio de la transcripción (ATG). Los oligonucleótidos F y R sensibles a metilación amplifican un fragmento de 146pb que incluye el inicio del núcleo del promotor del gen *Atxn2* y otros motivos de secuencia reconocidos por factores de transcripción como el *MecP2*. Las secuencias dianas de estos oligos (F y R) se encuentran a 126pb y 320pb cadena arriba del primer y segundo ATG respectivamente.

Tabla No.4. Cálculo de la temperatura de alineamiento. Sitio de unión y otras característica de los oligonucleótidos diseñados mediante el empleo del programa MethPrimer™.

Tipo de oligonucleótido	Dirección durante la amplificación	Total de nucleótidos	Sitio de unión (pb)	No. de CpG mapeados	Temperatura de alineamiento (°C)
Para reconocimiento de secuencias metiladas (MP)	(F)	T(12),C(3) G(5), A(6)	94-	6	68
	(R)	T(2),C(7) G(3), A(9)	240		66
Para reconocimiento de secuencias no metiladas (UP)	(F)	T(17),C(0) G(5), A(6)	92-	5	62
	(R)	T(2),C(9) G(0), A(12)	242		64

IV.3. Estandarización de la MSP.

IV.3.1. Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para la MSP.

Un ensayo estandarizado, es un método que brinda constantemente el mismo resultado para una muestra dada, cuando ha sido repetido varias veces y realizado por diversos analistas en diferentes laboratorios (OIE, 2004). Para estandarizar un ensayo analítico, primeramente es necesario demostrar y comprobar si el método es útil o no para el fin que fue diseñado, utilizando para ello materiales de referencia que permitan obtener resultados confiables.

El desarrollo y estandarización de un sistema de PCR, incluye optimizar toda una serie de parámetros críticos de los cuales depende este método, como es la concentración de MgCl₂, dNTPs, cebadores; además de determinar parámetros imprescindibles que permiten plantear que el sistema diseñado es confiable (Practical Molecular Biology, 2005).

Desde esta óptica y conociendo que la eficiencia en la amplificación de la PCR es dependiente de la cantidad y sobre todo de la calidad del ADN molde, además que la MSP incluye necesariamente el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio para transformar en uracilo las citosinas no metiladas, se determinó la eficiencia del proceso de modificación a través de una PCR convencional para diagnosticar la SCA2, no encontrándose reacciones positivas al gen SCA2 (Datos no mostrados). Los oligonucleótidos -DAN1/DAN2-, originalmente diseñados para reconocer secuencias nucleotídicas localizadas en el exón 1 del gen *Atn2*, no se alinearon con las cadenas moldes complementarias, impidiéndose por ello la amplificación que tendría lugar si hubiera ocurrido la PCR. Ello indicó que, una vez realizada la modificación del ADN, todas las citosinas no metiladas fueron transformadas y que las secuencias nucleotídicas moldes diferían a las del ADN genómico, en grado dependiente del estado de metilación original del gen en cuestión.

Una vez demostrado la eficiencia del tratamiento realizado y la completa transformación de todas las citosinas no metiladas, lo que permitía asegurar el alineamiento correcto de los oligonucleótidos diseñados para la MSP y por ende la imposibilidad de una pobre o nula amplificación dada la dificultad para reconocer

las secuencias blancos, fue determinada mediante el método de prueba y error la temperatura óptima de hibridación o alineamiento de los oligonucleótidos.

La temperatura de alineamiento correcta garantiza en gran medida la especificidad y en cierto grado, la amplificación en las PCR ([Wu et al., 1991](#)). Sin embargo, para la optimización de esta es necesario además imponer las condiciones experimentales que propicien una alta eficiencia de la reacción de amplificación y la obtención de una señal, una vez realizada la corrida electroforética, con un alto nivel de nitidez y el menor ruido posible. Para ello fue realizado un grupo de ensayos que permitieron determinar las concentraciones ideales de los diferentes componentes de la mezcla de reacción para la MSP. Estos datos no se muestran por estar pendientes a protección por patentes.

Los ciclos de temperatura determinados para la amplificación óptima fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 48°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos y finalmente, una extensión a 72°C por 5 minutos ([Herman et al., 1996](#); [Derks et al., 2004](#)).

La corrida electroforética de cada uno de los productos obtenidos con la MSP, evidenció bajo las condiciones experimentales consideradas finalmente como óptimas, la presencia de bandas que de forma general estaban en correspondencia con lo esperado según la variante de MSP desarrollada ([Figura No.7](#)). Sin embargo la corrida electroforética mediante la MSP empleando oligonucleótidos MP mostró una banda intensa, no esperada, que aparecía aproximadamente al nivel de los 50 pb. Esta señal es probable que sea el resultado de la formación de dímeros.

En los cebadores MP, la presencia de varias citosinas y guaninas que se unen de forma complementaria mediante tres puentes de hidrógenos y que además confiere una alta estabilidad a la unión, justifica y constituye la posible explicación para la aparición de la banda.

IV.3.2. Estudio de la especificidad y sensibilidad del método diseñado.

➤ Análisis de Especificidad.

La especificidad analítica de la PCR está dada por la habilidad de los oligonucleótidos para detectar una secuencia nucleotídica específica entre otras similares, que pudieran encontrarse comúnmente contaminando las muestras a estudiar (Dieffenbach et al., 1993; OIE, 2004). Partiendo de ese concepto, fue considerado como agente contaminante al ADN que permanece sin modificar después del tratamiento con bisulfito de sodio en medio básico, y al ADN modificado con un estado de metilación contrario al esperado según el tipo de cebador empleado; dada la potencialidad que muestran ambas moléculas para facilitar la ocurrencia de reacciones cruzadas durante la PCR.

Para demostrar que los oligonucleótidos diseñados eran lo suficientemente específicos durante su unión a las secuencias complementarias de ADN que habían sido previamente modificadas, fue realizada una MSP usando cadenas moldes de ADN genómico (Herman et al., 1996). Como muestran las Figuras No. 7 y 8 los oligonucleótidos diseñados sólo reconocen secuencias que han sido previamente tratadas. Este resultado, confirma la imposibilidad de obtener falsos positivos si la muestra objeto de estudio no hubiera sido exhaustivamente modificada y permite a su vez, evaluar la magnitud de los mecanismos moleculares que controlan el estado de metilación como posible respuesta celular ante el efecto tóxico de la proteína mutada y como herramienta reguladora de la función nativa de la proteína salvaje.

El análisis de la Figura No.7, que refleja el resultado de la MSP usando cebadores MP, muestras modificadas de pacientes y ADN control completamente metilado, como se ha sugerido para realizar una correcta interpretación de los resultados (Derks et al., 2004), evidenció la presencia de una banda en control exclusivamente. Esto indicó que los pacientes seleccionados presentaban en el momento del análisis muy bajos niveles o no poseían variantes alélicas en las que la secuencia promotora estaba completamente metilada y que por tanto, el método analítico desarrollado era lo suficientemente específico como para distinguir entre

las diferentes variantes de metilación existentes; es decir, regiones promotoras parcialmente metiladas, hipermetiladas y no metiladas.

La corrida electroforética del producto de la MSP desarrollada empleando oligonucleótidos UP, mostró en cuatro de las cinco muestras de ADN modificado de pacientes y en el ADN control, la presencia de una banda que no aparecía en el agua (Figura No.7). Esta distribución específica de bandas demostró la imposibilidad de falsos positivos por concepto de contaminación durante el montaje del experimento. Además confirmó que el patrón de metilación *de novo* es específico para cada paciente, pudiendo existir casos en los cuales las regiones promotoras de las variantes alélicas se encuentra en un estado intermedio entre hipermetilación y la no metilación, constituyendo patrones que escapan a la especificidad de la técnica analítica desarrollada.

Los resultados corroboraron además que los oligonucleótidos diseñados para secuencias no metiladas, al igual que los diseñados para reconocer secuencias metiladas, eran por tanto lo suficientemente específicos como para distinguir entre las diferentes variantes de metilación existentes.

Como el proceso de alineamiento de los oligonucleótidos no sólo podía ser inespecífico por la posibilidad de ocurrencia de reacciones cruzadas, sino por la unión a regiones homólogas a la secuencia complementaria blanco para las que fueron diseñados y con el estado de metilación adecuado según el tipo de análisis planificado, fue realizada una MSP utilizando dos parejas de oligonucleótidos que reconocen secuencias completamente metiladas y no metiladas. Posteriormente, con el producto obtenido fue efectuada una nueva PCR usando otro cebador ((oligonucleótido Taqman® (Tib-Mol Biol, Berlin DE)) que se alineaba a las secuencias nucleotídicas comprendidas dentro de las cadenas de ADN amplificadas en la MSP (*nested-MSP, por su siglas en inglés*) (Figura No.8) y ambos productos corridos contra un patrón de peso molecular.

El uso de los oligos Taqman® unido a oligos convencionales, permitía cubrir ~45% de la secuencia total amplificada mediante la nested-MSP (67/146 pb) y ~47% de los dinucleótidos CG (11/23 unidades). Esto nos evitaba la secuenciación para probar la identidad del producto amplificado, dado que en la secuencia promotora

los dinucleótidos CG se encuentran distribuidos variablemente. Desde esa óptica la amplificación mediante una nested-MSP soporta la detección inequívoca del fragmento correspondiente a la región promotora del gen SCA2.

Las Figuras No. 7 y 8 muestran que como resultado de la MSP se obtienen copias de la secuencia de ADN a amplificar de aproximadamente 150 pb, en correspondencia con lo esperado según el análisis bioinformático. La electroforesis del producto de la nested-MSP usando oligonucleótidos UP (Figura No.8), en cambio, mostró que el producto generado era de tamaño menor que las cadenas moldes utilizadas para la realización del experimento ~120 pb aproximadamente-.

Las reacciones de amplificación mediante la nested-MSP fueron realizadas usando el EpiTect MSP Kit® (Qiagen, Hilden DE) y siguiendo las instrucciones del fabricante en el EpiTect MSP Handbook. Este Kit incluye una polimerasa modificada genéticamente -HotStarTaq® d-Tect Polymerase-, que discrimina eficientemente errores de complementariedad entre nucleótidos (mismatch) en el extremo 3' de los oligos durante la fase de unión y extensión de la cadena de DNA. Durante la reacción, de existir un solo error en la unión la enzima no amplifica la secuencia de DNA ([Qiagen® Product Guide, 2009](#)).

Considerando que la amplificación mediante una nested-MSP sólo ocurre si la PCR que la antecedió ha generado productos con secuencias complementarias a los oligonucleótidos diseñados para la nested-MSP ([Dieffenbach et al., 1993](#)), podemos afirmar que la especificidad de la señal observada fue establecida a 3 niveles. El primero de estos determinado por la coincidencia con el peso molecular esperado en ambas MSP, el segundo por la identificación de errores usando la polimerasa d-Tect, y el tercero mediante el reconocimiento específico de la configuración de los CG en el promotor SCA2.

Dado los resultados discutidos anteriormente, puede ser afirmado que los oligonucleótidos empleados en la MSP muestran una alta especificidad. La MSP pudiera ser por tanto empleada para el desarrollo de posteriores investigaciones dirigidas a determinar la variabilidad de los patrones de metilación en la SCA2, si se caracterizara por un adecuado nivel de sensibilidad.

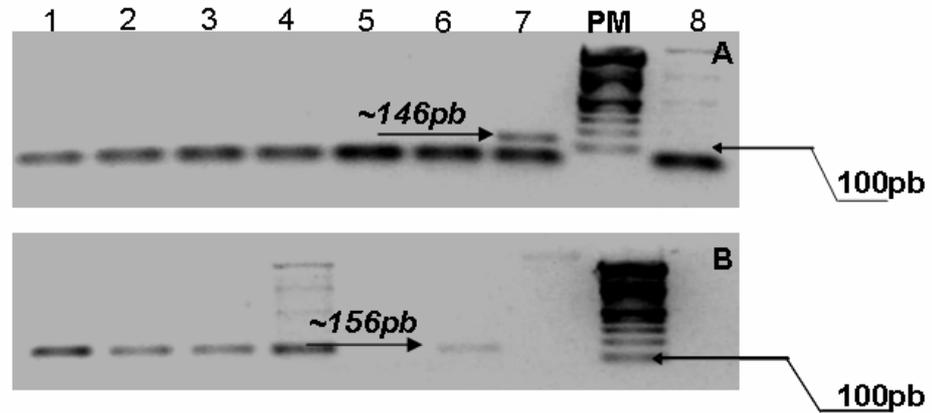


Figura No.7. Análisis de especificidad de la MSP. Amplificación mediante el uso de oligonucleótidos diseñados para reconocer secuencias genómicas modificadas hipermetiladas (A) y no metiladas (B). 1, 2, 3, 4 y 5: Muestras modificadas de ADN de pacientes, 6A: ADN genómico control no modificado, 7A: ADN control modificado e hipermetilado, 6B: ADN control modificado y no metilado, 7B: ADN genómico control no modificado, PM: Patrón de peso molecular y 8: Agua.

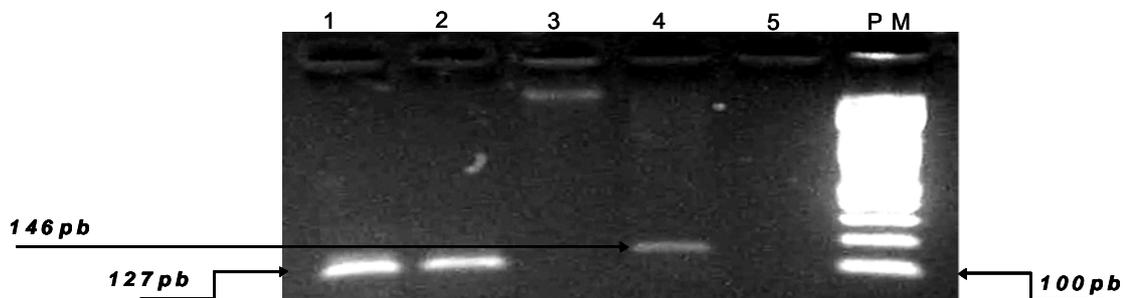


Figura No.8. Análisis de la especificidad de la MSP mediante la variante Nested-MSP. 4: Producto obtenido mediante una MSP usando ADN control no metilado modificado y oligonucleótidos que reconocen este tipo de secuencia (R y F), 1 y 2: Productos obtenido mediante el empleo de las secuencias amplificadas en la MSP como molde para la reacción y oligonucleótidos que reconocen y alinean a estas secuencias (Nested-MSP), 5: agua, 3: ADN control no modificado y PM: Patrón de peso molecular. MSP, del inglés: Methyl-Specific PCR; Nested-MSP: Nested Methyl-Specific PCR.

➤ Análisis de sensibilidad.

La sensibilidad analítica o límite de detección, es la mínima cantidad de analito que es capaz de detectar el ensayo y puede ser representado como el número de copias del genoma de la muestra en estudio (Dieffenbach et al., 1993). Para determinarla, se recomienda calcular el punto final de corte, el cual se define como el mínimo de secuencias blanco por volumen de muestra que es capaz de detectar el ensayo.

En la actual investigación la sensibilidad de la MSP fue determinada mediante la ejecución de cuatro experimentos. Dos de estos, considerando que en cada individuo podrían coexistir variantes alélicas con diferentes niveles de metilación, consistieron en la realización de una curva con ADN control comercial producido por la firma Qiagen (Hilden, Berlín DE). La misma abarcaba el rango de 40 a 0 ng de ADN íntegramente metilado en un fondo de ADN totalmente no metilado y viceversa. Este procedimiento fue realizado de acuerdo a las especificaciones del comerciante en el EpiTect PCR Control DNA Set (100)® Handbook 2008 (Qiagen, Hilden DE).

Los restantes dos experimentos, teniendo presente que el ADN remanente producto de una ineficiente modificación con bisulfito de sodio constituye un importante contaminante de la MSP, por lo que podría influir en los resultados, consistieron en el análisis de concentraciones variables de ADN control no metilado e hipermetilado -0.03, 0.003 y 0 ng-, en un fondo de ADN genómico (Herman et al., 1996).

La Figura No.9 muestra que la MSP diseñada en sus dos variantes (usando los oligonucleótidos UP y MP) permite la detección hasta de 0.1 ng de ADN modificado con el estado de metilación esperado en un fondo de ADN con un estado de metilación diferente. En otras palabras, la técnica tiene un límite de detección que admite analizar en su rango inferior hasta aproximadamente 33 copias de la variante alélica en investigación (Tabla No.5). Estos niveles de sensibilidad son inferiores a los reportados por Herman y colaboradores (1996) en

una investigación donde se analizó el estado de la metilación en supresores de oncogenes p16 y E-cadherin (100 vs 50 pg, respectivamente).

Cuando se usó ADN genómico como fondo, la reacción de MSP usando oligonucleótidos para metilación mostró mayor sensibilidad, alcanzando un límite de detección de 0.03 ng de ADN, lo que equivale a 10 genocopias de ADN hipermetilado (Tabla No.5).

La comparación de los límites de detección alcanzados por la MSP bajo las condiciones experimentales impuestas, demostró que en presencia de ADN genómico y no de ADN modificado no metilado se triplica la sensibilidad de la MSP con el uso de oligonucleótidos diseñados para reconocer secuencias en estado hipermetilado (Figura No.9). Esto pudiera deberse a que el ADN de alto peso molecular pudiera ejercer un efecto "carrier" o matriz sobre el ADN modificado y potenciar la amplificación de este último (Nathan y Fox, 1997), un efecto que al parecer se pierde en el ADN modificado producto de su fragmentación parcial durante el tratamiento con bisulfito de sodio.

La unión de los oligonucleótidos MP a su secuencia "target" ó diana es más estable que la manifestada por cebadores diseñados para amplificar cadenas hipometiladas, debido al mayor número de dinucleótidos CG en los oligonucleótidos MP que en UP. La elevada estabilidad termodinámica de la unión oligonucleótido MP-secuencia blanco y el efecto matriz producido por el ADN genómico, hacen más eficiente la reacción de MSP para metilación, potenciando por tanto su sensibilidad.

En la Figura No. 9 se observa que tanto en la MSP-MP como en la MSP-UP, aparece una señal a nivel de los 0.1ng de ADN con el estado de metilación correcto según la variante MSP que se esté analizando. Sin embargo la intensidad de ambas señales no es equivalente, siendo inferior en el caso de la MSP-UP, probablemente por la menor estabilidad de la unión oligonucleótido UP-secuencia blanco.

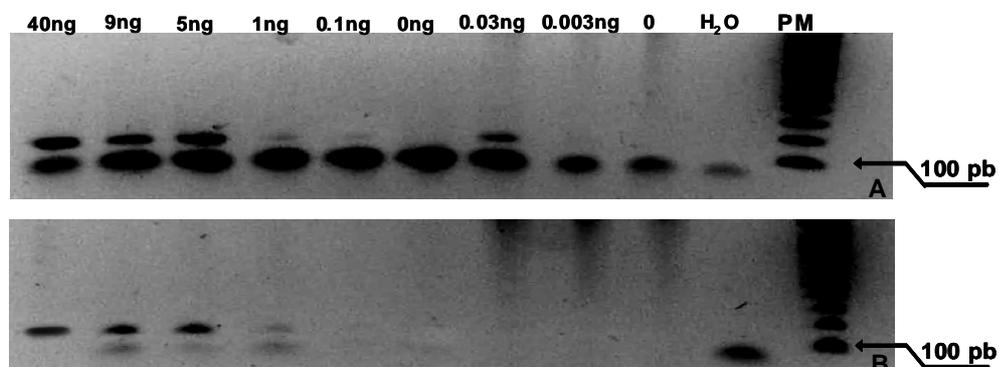


Figura No. 9. Evaluación de la sensibilidad de la MSP a través del método de las Diluciones Seriadas. **A:** Dilución de ADN control hipermetilado en un fondo de ADN no metilado (40 - 0 ng), así como en ADN genómico no modificado (0.003 - 0 ng). **B:** Dilución de ADN control no metilado en un fondo de ADN hipermetilado (40 - 0 ng) y ADN genómico no modificado (0.003 - 0 ng). **PM:** Patrón de peso molecular; **MSP**, del inglés: Methyl-Specific PCR.

Tabla No. 5. Límites inferiores de detección de las variantes de MSP diseñadas.

	Interferente No. 1		Interferente No. 2	
	ng (%metilación)	Número de copias alélicas	ng (%metilación)	Número de copias alélicas
MSP-MP	0.1(1)	33	0.03 (0.3%)	10
MSP-UP	0.1(1)	33	ND	ND

Interferente No. 1: ADN control modificado con estado de metilación contrario al adecuado según la variante de MSP desarrollada. Interferente No. 2: ADN genómico sin modificar ND: No detectable.

La presencia de varias citosinas y guaninas, incluidas las relacionadas con el dinucleótido CpG en los cebadores MP y en particular la unión de ambas bases a través de 3 puentes de hidrógeno, confiere una alta estabilidad termodinámica a la unión oligonucleótido-secuencia blanco y permite un eficiente proceso de amplificación en la MSP-MP. Por ello se manifiesta su elevado nivel de sensibilidad en comparación con la MSP-UP, que emplea oligonucleótidos con un menor número de citosinas al ser estas sustituidas por adeninas en el dinucleótido CpG, para garantizar la complementariedad a la cadena molde de ADN modificado.

Las condiciones experimentales sugeridas por Qiagen (8°C por debajo de la temperatura de alineamiento de cada oligonucleótido), por otro lado pudieron favorecer más la reacción de metilación que la de no metilación y por tanto potenciar la eficiencia de esta reacción. Wojdacz y sus colegas han encontrado que el equilibrio hacia una u otra reacción (metilación ó no-metilación) puede controlarse mediante la manipulación de la temperatura de alineamiento de los cebadores, encontrándose que con sólo una pareja de oligos (bien para metilación o para no metilación) se puede amplificar tanto secuencias hiper como no metiladas ([Wojdacz et al., 2006](#)).

El trabajo además incluyó un ensayo en el que el proceso de modificación de las muestras se realizó partiendo de concentraciones variables de ADN, correspondientes con las cantidades de ADN extraído mediante el método Nucleon II. El objetivo fue verificar si la MSP diseñada era lo suficientemente sensible como para detectar la secuencia diana y permitir un adecuado análisis una vez extraído, purificado y modificado el ADN. Este experimento es necesario si se considera que durante todas estas etapas y en especial durante el tratamiento con bisulfito de sodio, para lograr la transformación de las citosinas no metiladas a uracilo, se pierde aproximadamente el 90% de las moléculas de ADN lo cual influye negativamente en la sensibilidad de esta técnica ([Raizis et al., 1995](#); [Gunau et al., 2001](#)).

En la Figura No.7 se presentan los resultados de la MSP usando cebadores diseñados para estudiar la región promotora del gen *Atxn2* en estado no

metilado. Esta refleja la presencia de bandas de intensidad variable que confirman que el límite de detección de la MSP es inferior a la concentración de secuencias dianas generadas post-tratamiento, evidenciándose que no era necesario el uso de otros métodos de separación y purificación del ADN para realizar el estudio.

El análisis de la [Figura No.7](#), además evidenció que la señal de menor intensidad correspondía a la muestra de ADN que antes de la modificación presentaba una concentración significativamente superior en comparación a las restantes incluidas en el experimento. Esto constituía una contradicción aparente debido a que la cantidad de ADN no fragmentado afecta el rendimiento de la PCR ([Raizis et al., 1995](#)).

Bajo condiciones estándar el número de moléculas modificables, por tanto la concentración de ADN de simple cadena y del producto obtenido durante la MSP, dependerá de la proporción de citosinas intra e intercatenarias modificables una vez tratadas con bisulfito de sodio. En otras palabras, obedecerá al patrón de metilación que caracteriza cada una de las moléculas de la muestra de ADN estudiada.

En el proceso de modificación la estequiometría de la reacción define el número de citosinas modificables. En muestras que han sido tratadas de forma estándar este número permanece constante y es por ello que muestras de ADN con cantidades iguales de citosinas intracatenarias modificables, pero con concentraciones diferentes, diferirán en cuanto a la cantidad de producto obtenido en la MSP como resultado de la disminución en la probabilidad de producirse cadenas molde con el estado de modificación adecuado que garanticen un correcto alineamiento de los oligonucleótidos ([Herman et al., 1996](#)).

La intensidad de la señal obtenida en la electroforesis del producto de una MSP dependerá de la relación que se establezca entre la concentración de ADN antes de la modificación y de los propios patrones de metilación; los que constituyen una característica distintiva de cada paciente.

IV.4. Empleo de la MSP en la investigación de la SCA2.

IV.4.1. Metilación como elemento de diferenciación intrafamiliar.

Los patrones de metilación se caracterizan por una amplia variabilidad intra e interindividual y, consecuentemente, podrían contribuir a la variabilidad del fenotipo clínico en la SCA2. Para demostrar la aplicabilidad del método analítico desarrollado a la investigación de esta enfermedad, se analizó si el nivel de sensibilidad que caracteriza la técnica MSP permite detectar las diferencias particulares potencialmente existentes entre pacientes con una gran similitud genética.

Fue considerado como modelo de reto o prueba ideal para determinar la capacidad resolutoria de la MSP atendiendo a su nivel de sensibilidad, el estudio de gemelos monocigóticos por ser estos los máximos exponentes de similitud genética. De igual manera, se tuvo en cuenta sus descendientes directos.

En la investigación, el análisis de la metilación incluyó dos hermanas gemelas monocigóticas (ver haplotipos en la Figura No. 10B) que presentaron una diferencia de siete años respecto a la edad de inicio (Figura No. 10B, pacientes II.1 y II.2), así como al hijo de una de ellas que debutó clínicamente a los 37 años (6 años antes respecto a la madre y 13 respecto a la tía) (Figura No. 10B, paciente III.1).

La marcada anticipación de la edad de inicio del paciente III.1 respecto a su madre no es atribuible a una expansión intergeneracional de la mutación genética. La anticipación genética, o sea la disminución de la edad de aparición de las manifestaciones clínicas en generaciones sucesivas, es muy frecuente (80%) en la SCA2 ([Velázquez et al., 2009](#)). Siendo su base molecular la inestabilidad intergeneracional del triplete de CAG del locus SCA2 ([Pulst et al., 1996](#)).

Se evaluaron en cada uno de los individuos incluidos, diferentes marcadores de haplotipaje para estimar la similitud del contexto genético en el cromosoma 12 y en el 14. Esto permitió evaluar la influencia de factores que pudieran estar actuando en *cis* y en *trans* sobre la expresión génica de *Atxn2*, y en particular sobre la metilación de su promotor ([Cleary y Pearson, 2003](#)).

Reportes previos habían señalado que, en un modelo animal donde fueron introducidos fragmentos genómicos con secuencias repetitivas expandidas de CAG de personas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 7 (SCA7), el contexto genómico próximo a la mutación era necesario para producir una acción en *cis* sobre la inestabilidad de las expansiones (Libby et al., 2008). Esta región contenía sitios de unión para la proteína CTCF, que participa en el remodelado de la cromatina y de los cambios conformacionales del ADN, así como en la regulación de la transcripción a través de la metilación (Ohlsson et al., 2001).

El resultado obtenido en el experimento confirmó que la técnica MSP diseñada, dado su elevado nivel de sensibilidad, se caracteriza por un poder resolutivo suficiente como para detectar diferencias en cuanto al nivel de metilación entre individuos con una gran similitud genética. Por ejemplo se evidenció que el paciente III.1, en comparación con su madre (paciente II.1), presentaba una disminución en el nivel de la señal obtenida en la corrida electroforética (Figura No. 10C). Para el II.1, sin embargo, se obtuvo una señal equivalente a la del control estudiado (III.2) (Figura No. 10C).

En el experimento, la MSP fue realizada empleando oligonucleótidos diseñados para reconocer secuencias no metiladas en el promotor del gen *Atxn2*, lo que equivale a haber determinado que proporción de las dos variantes alélicas están disponibles para ser transcritas.

La presencia de grupos metilos en las secuencias promotoras de los genes, constituye un impedimento estérico para la unión de la enzima ARN polimerasa y de proteínas relacionadas con la transcripción (Vaissiére et al., 2008). La menor intensidad de la señal observada en el paciente III.1 en comparación con el III.2, por tanto sugiere una reducida expresión génica de *Atxn2*. Ello presupone una intervención inadecuada de la ataxina-2 nativa en los procesos metabólicos que involucran a esta proteína.

Teóricamente, la aparición anticipada de la edad de inicio en el paciente III.1 podría ser consecuencia de un bajo nivel de expresión de ataxina-2 normal, que implique una disminución significativa de su concentración intracelular, y producto de ello, la pérdida parcial de la función fisiológica de esta proteína. Esto aceleraría

la apoptosis celular y por tanto, el proceso neurodegenerativo al ocurrir de forma simultánea el efecto citotóxico producido por la ganancia de función de la ataxina-2 mutada y la pérdida de función fisiológica producto de los niveles disminuidos de la variante nativa de la proteína.

La influencia de las bajas concentraciones de ataxina-2 en la homeostasis celular, fue estudiada por Nonhoff y colaboradores (2007). Estos investigadores, demostraron que bajos niveles de la proteína producen una significativa reducción en el número y tamaño de los gránulos de estrés. Ello indica que la ataxina-2 es muy importante en el ensamblaje de estos dominios citoplasmáticos involucrados en el control postranscripcional de la traducción genética en condiciones de estrés (Kedersha y Anderson, 2000).

La disminución de la concentración de ataxina-2 produce un incremento en las cantidades de PABP citoplasmática (Nonhoff et al., 2007). Esta proteína forma parte de los gránulos de estrés y actúa como una reguladora importante de la traducción de ARN mensajero (ARNm). El incremento de PABP citoplasmática a su vez se traduce en una mayor eficiencia en la etapa de terminación de la traducción (Sachs y Geballe, 2006).

En la paciente II.1, la intensidad de la señal obtenida en la corrida electroforética -similar a la del control- (Figura No. 10C), sugiere una regulación de la expresión del gen *Atxn2* y la existencia de niveles de ataxina-2 tanto normal como mutada, semejantes a la de individuos sanos no portadores de la mutación. Esto podría contribuir a explicar la anticipación de la edad de inicio de esta paciente respecto a su hermana gemela, si se considera que en los pacientes producto de la expansión de la secuencia repetitiva de CAG la metilación debe producirse en un mayor grado en comparación con personas sanas.

Altas concentraciones de la ataxina-2, tanto en su variante normal como expandida, producen una reducción significativa de los cuerpos P y de la proteína PABP (Nonhoff et al., 2007). Por otro lado, niveles bajos de PABP inhiben la iniciación de la traducción debido a su intervención en la formación de estructuras circulares de ARNm mediante su unión al complejo de inicio de la traducción eIF4,

que regula el proceso de traducción facilitando el reciclaje de ribosomas (Kahvejian et al., 2005).

Desde estas perspectivas, la desregulación en la expresión de ataxina-2 probablemente afecte la síntesis de proteínas vinculadas a la protección y supervivencia celular en la condición de estrés a que están sometidas las células de los pacientes con SCA2. Esto respondería al limitado ensamblaje de los gránulos de estrés y de los cuerpos P, así como a las alteraciones en la concentración intracelular de la proteína PABP.

Pacientes con SCA2 que muestran concentraciones pequeñas de ataxina-2 y poco ensamblaje de gránulos de estrés, probablemente serán más susceptibles a los efectos adversos desencadenados por la ataxina-2 mutante. Esto resulta del aumento de la concentración de PABP intracelular, que ocasiona un incremento en la eficiencia de la traducción global de los ARNm y no de los necesarios específicamente para desencadenar una respuesta ante un agente estresante.

Durante la condición de estrés, para la supervivencia celular se requiere que ciertos transcriptos involucrados en la respuesta contra un agente estresante reciban una alta prioridad traduccional, y no aquellos genes que se expresan ubicuamente (Kedersha y Anderson, 2000).

Teóricamente en los pacientes con concentraciones elevadas de ataxina-2, al disminuirse el ensamblaje de los cuerpos P, ocurrirá un menor secuestro de ARNm y por tanto un aumento de su disponibilidad para ser traducido. Por otro lado, al inhibirse la iniciación de la traducción producto de la insuficiente disponibilidad de PABP, se producirá una síntesis inadecuada de ARNm necesarios para la respuesta ante un agente estresante. Esto estaría asociado al establecimiento de una especie de competencia por la traducción entre los ARNm, al igual que ocurre en condiciones de bajo niveles de ataxina-2.

En pacientes con SCA2 el estrés oxidativo se ha asociado con la pérdida de la respuesta celular antioxidante tanto enzimática como no enzimática (Almaguer y Almaguer, 2005). Esta respuesta antioxidante aumenta, sin llegar nunca a nivel de los controles, a medida que lo hace el mosaicismo somático (existencia de subpoblaciones celulares con diferentes números de repeticiones de CAG) (Almaguer

[et al., 2009](#)). Esto pudiera indicar que la activación de la respuesta celular ante el agente estresante (ataxina-2 mutada) y otros factores involucrados en sus mecanismos de acción, es ineficiente.

En la SCA2, a medida que incrementa el CAG aumenta la formación de estructuras secundarias no convencionales como las horquillas, el mosaicismo somático, y debido a la síntesis ataxina-2 mutada con grandes trectos poliglutamínicos, además la probabilidad de secuestro del factor transcripcional Sp1 ([Sinden et al., 2002](#); [Pearson et al., 2005](#)). Todo ello propiciará la metilación de la región promotora del gen *Atxn2* como respuesta protectora ante el agente estresante ataxina-2 mutada.

Con el aumento de la secuencia repetitiva de CAG en el alelo mutado también lo hace gradualmente, producto del mayor tracto poliglutamínico, el carácter citotóxico en la proteína, lo que contrarresta el efecto protector de la metilación ([Hiushan et al., 2007](#)). Si a ello se agrega que la metilación potencialmente pudiera ocurrir sobre el promotor de la variante alélica normal del gen *Atxn2*, entonces el tipo de respuesta y la supervivencia celular dependerá de la especificidad de los procesos de metilación. Debe destacarse, que además la supervivencia celular será definida por el estado de equilibrio entre el nivel de metilación en las variantes alélicas mutadas y el carácter citotóxico del tracto poliglutamínico.

Desde el punto de vista clínico, entre individuos con expansiones repetitivas superiores a 41 CAG en el gen *Atxn2*, las diferencias fenotípicas no son significativas ([Velázquez et al., 2009](#); [Almaguer, 2009: comunicación personal](#)). En presencia de esta condición genética, al parecer la protección por concepto de baja expresión de la variante alélica mutada tendrá una pobre influencia sobre el cuadro clínico, a pesar de provocar niveles particularmente bajos de la proteína mutante. El poderoso efecto citotóxico de las variantes proteicas con estructuras tridimensionales afectadas de forma muy significativa como ocurre en estos casos, podría constituir el fundamento de este comportamiento.

En personas con expansiones repetitivas de CAG menores de 41 los afectos adversos de la proteína, al tener esta un menor grado de daño estructural respecto

a la forma nativa, tendrán una menor relevancia y por tanto habrá un mayor equilibrio entre el efecto citotóxico de la proteína mutante y los mecanismos de protección. Por ejemplo, en estos individuos el grado de metilación sería menor y la expresión del gen mayor, sin embargo dado el reducido efecto citotóxico de la proteína mutante, existirá un mayor equilibrio entre los efectos nocivos y los mecanismos de protección. La variabilidad clínica en estos casos será más dependiente de las diferencias inter-individuales respecto a la intensidad de los mecanismos de protección.

En la SCA2 la única evidencia científica que apoya esta hipótesis es el resultado de un estudio realizado en el 2004. La investigación, que consistió en un análisis parcial de los patrones de metilación en dos pacientes con una secuencia repetitiva de 37 CAG, demostró la presencia de metilación alelo-específico en ambos pacientes. Sin embargo, el paciente en el cual los síntomas clínicos aparecieron más tardíamente presentaba mayor metilación de la región promotora del gen *Atxn2* (Bauer et al., 2004).

La existencia de fenotipos clínicos con diferentes grados de severidad, según Bauer y colaboradores (2004), se debe a la variabilidad de los niveles de ataxina-2. Estos sugirieron además que la inestabilidad en los niveles de la ataxina-2 podría estar asociada a cambios de la expresión del gen *Atxn2*.

Bauer y colaboradores mostraron por primera vez la existencia de una probable relación entre el fenotipo clínico en la SCA2 y el estatus de metilación. Sin embargo, su estudio estuvo limitado por el número de pacientes (2 mujeres), tejido usado (fibroblastos de piel), así como por la estrategia de estudio de la metilación (inhibición de las enzimas DNMT y empleo de la técnica RT-PCR (*del inglés: Reverse transcription polymerase chain reaction*) para determinar el nivel de transcritos en células tratadas y sin tratar con 5-aza-20-deoxicidina).

La droga 5-aza-20-deoxicidina permite determinar indirectamente el estado de metilación, al inhibir la adición covalente de los grupos metilo por acción de las enzimas DNMT, y producir una alteración en los niveles de expresión de un gen de forma proporcional al nivel de metilación de su secuencia promotora. Sin

embargo, su empleo tiene como limitante que no actúa de forma específica sobre el promotor de un gen en particular, como es el caso de *Atxn2*.

El accionar inespecífico de la droga 5-aza-20-deoxicitidina afecta la confiabilidad de los resultados porque pudiera producirse un cambio en la expresión de un gen en particular, que dependería no sólo de su propio estado de metilación, sino de la intensidad de la afectación producida sobre otros genes importantes en el control de la expresión genética, tal es el caso de las enzimas acetil-transferasas ([Schneider y Grosschedl, 2007](#)). Desde este punto de vista, el propio autor destaca la necesidad de hacer otros análisis a mayor escala y más específicos para corroborar el resultado.

En los pacientes incluidos en el modelo de reto fue analizado además de la metilación, el número de repeticiones del triplete de nucleótidos CAG en el gen de la Ataxia SCA3, atendiendo a que este constituye un modulador del fenotipo clínico en la SCA2 ([Mederos et al., 2009: comunicación personal](#)) y diferentes marcadores de haplotipaje.

Entre los pacientes, la inexistencia de diferencias respecto a los marcadores de haplotipaje y por tanto entre posibles efectos en *cis* del contexto genético, no permiten explicar las diferencias de las edades de inicio. El debut anticipado del paciente III.1 sin embargo pudiera ser también atribuible, al menos parcialmente, a la expansión intergeneracional del número de repeticiones del trinucleótido CAG que presenta en el gen *Atxn3*.

Esta investigación sugiere que la supervivencia celular y el fenotipo clínico en la enfermedad dependen fuertemente del estado de metilación de promotor del gen *Atxn2*, más importante aun, de la concentración intracelular de las variantes mutadas y nativas de ataxina-2, al constituir ambas posibles desencadenantes de la apoptosis. De la misma, además se concluye que en la SCA2 la expresión clínica podría no sólo responder a la mutación genética, sino que es el resultado de la influencia de disímiles factores genéticos, epigenéticos, ambientales y de sus interacciones. Esto ha sido evidenciado en otras investigaciones, incluidas algunas relacionadas con la propia SCA2, Corea de Huntington y SCA1 ([van de Warrenburg et al., 2005](#); [Graham et al., 2006](#); [Kim et al., 2007](#)).

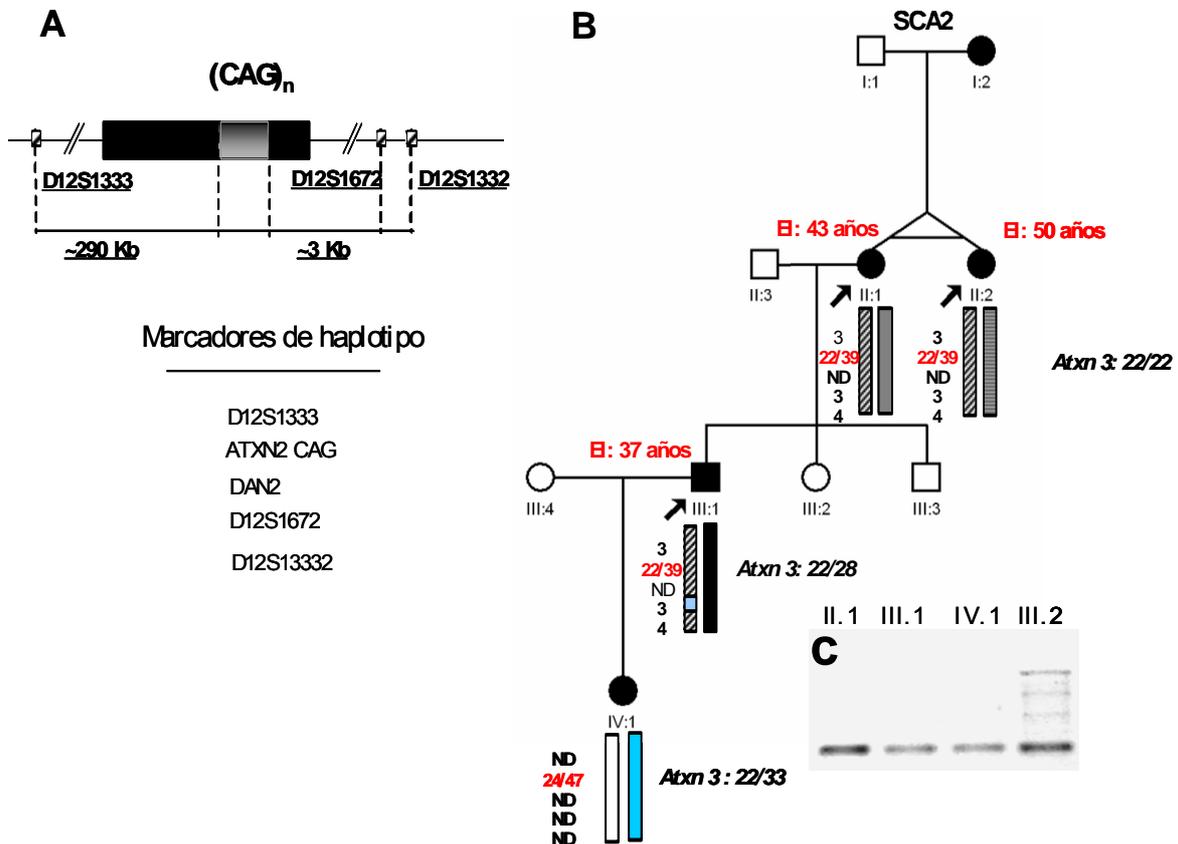


Figura No.10. MSP e investigación en la SCA2: Empleo del estado de metilación del promotor del gen *Atxn2* y del contexto genético como posibles herramientas para explicar la variabilidad fenotípica de los pacientes con similar grado de daño genético. **Número en letra negra a la izquierda de cada pareja de cromosomas:** Resultados de los marcadores de haplotipo; **Números en letra roja y cursiva a la izquierda de cada pareja de cromosoma:** Repeticiones del trinucleótido CAG para el gen *Atxn2*; **Número en letra negra a la derecha de cada pareja de cromosomas:** Repeticiones del trinucleótido CAG para el gen *Atxn3*; **A:** Sitios de unión de los marcadores de haplotipo estudiados; **B:** Árbol genealógico de una familia con ataxia SCA2; **C:** Resultado de la MSP mediante el empleo de oligonucleótidos diseñados para reconocer secuencias no metiladas; **Barras de colores localizadas en la parte inferior de los pacientes representados:** Cromosoma 12; **Ei:** Edad de aparición de las manifestaciones clínicas.

IV.4.2. Metilación como elemento distintivo de individuos no emparentados.

Como otra prueba para demostrar la utilidad y aplicabilidad del método analítico desarrollado, fue estudiado el estado de metilación de 14 pacientes con SCA 2 pertenecientes a diferentes familias y 13 controles sanos (no portadores de la mutación SCA2).

El análisis de enfermos no emparentados constituye un modelo de reto que permite demostrar si la sensibilidad de la MSP es adecuada para detectar diferencias particulares potencialmente existentes entre pacientes con expansiones diferentes de CAG en el locus 12q24.1. La inclusión de individuos sanos, por otro lado posibilita demostrar si dado la sensibilidad de esta técnica analítica es posible estudiar controles, donde el nivel de metilación debe encontrarse a un nivel basal asociado a la influencia de factores ambientales y nutricionales (Kim et al., 2009).

La MSP fue realizada empleando los oligonucleótidos UP y MP que enmarcan las secuencias (94-240 pb) y (91-242 pb), respectivamente. La corrida electroforética del producto de la amplificación con la técnica analítica, mostró bandas de intensidad variable para ambas variantes de la MSP (Figura No. 11A, B). Esta variabilidad en la intensidad de las señales observadas, constituye una evidencia de que dado su alto nivel de sensibilidad la MSP diseñada permite revelar posibles diferencias entre los patrones de metilación de pacientes SCA2, asociadas no sólo al contexto genético sino al medioambiental.

De los resultados obtenidos, además se infiere que los enfermos con SCA2 presentan un elevado nivel de metilación en la región nuclear del promotor *Atxn2* (Figura No. 11A, B). Sin embargo, más interesante es el hecho de que esto se repite en personas sanas, lo que sugiere un estricto control de los niveles de expresión de ataxina-2 tanto mutada como normal, dado su capacidad para promover la apoptosis celular (Wiedemeyer et al., 2003).

Teniendo en cuenta el hecho de que tanto los controles como los pacientes presentaban un alelo metilado y uno no metilado (M/U), fue desarrollado un análisis de frecuencia mediante el empleo de la prueba de la Chi-cuadrado (Tabla

No.6). Se evidenció que los pacientes, en comparación con los controles, presentan una mayor frecuencia de aparición de la combinación M/U, y que sólo en los controles aparece la combinación U/U (Figura No. 11A, B). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas desde el punto de vista estadístico.

Aunque las evidencias indican que las diferencias respecto a los patrones de metilación son producto del azar y no alteraciones del comportamiento teóricamente esperado del estado de metilación en respuesta a la presencia de la mutación, la variabilidad de la intensidad de las señales observadas tanto en pacientes como en controles, partiendo de concentraciones iniciales de ADN equivalentes, sugieren que la metilación de la región promotora contribuye a modular el fenotipo en la SCA2.

Por el momento es difícil medir el nivel de metilación en los motivos CpG, pues ensayos cuantitativos en tiempo real son necesarios para poder comparar y establecer correlaciones entre el nivel de metilación y otras variables utilizadas en el diagnóstico y caracterización clínica de la enfermedad. Sin embargo, dado el importante papel que juega la metilación del ADN en la regulación de la transcripción, el hecho de que en controles y en pacientes no haya aparecido la combinación M/M -lo cual sugiere que el gen se está expresando continuamente-, y que en los pacientes no exista la combinación U/U, es una evidencia que el estado metilación de las variantes alélicas del gen *Atxn2* podría influir sobre el fenotipo clínico ([Bauer et al., 2004](#); [Robertson, 2005](#); [Klose y Bird, 2006](#)).

La existencia en todos los pacientes estudiados de un alelo metilado y uno sin metilar, ya sea el que codifica para la ataxina-2 nativa o el que lo hace para la ataxina-2 expandida, podría implicar una alteración del fenotipo clínico. La metilación de la variante normal del promotor del gen *Atxn2* conducirá a un aumento de la severidad de la enfermedad y la segunda, a una disminución de la velocidad de progresión y la existencia de un cuadro clínico menos severo.

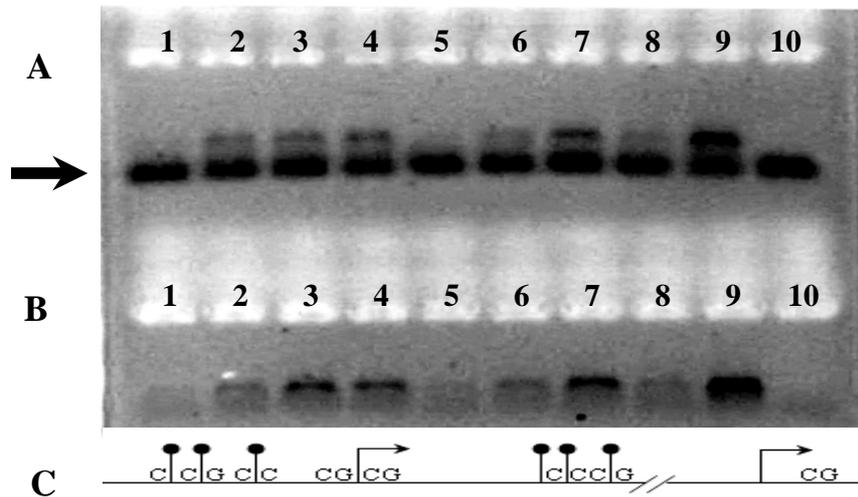


Figura No.11. MSP para el promotor del gen *Atxn2* usando los oligonucleótidos UP y MP. Carriles del 1-9 ADN de pacientes. Carril 10 control interno de la reacción de PCR sin ADN. A) Reacción sensible a la metilación. Carril 8 muestra no portadora de la mutación SCA2. La flecha indica la formación de dímeros de los oligonucleótidos que reconocen la secuencia metilada. B) Reacción sensible a la no metilación. C) Esquema simplificado de la región amplificada por los oligonucleótidos. Las barras con bolas en negrita representan los sitios metilados del promotor SCA2. Las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción (ATG). Se muestran otros motivos G/C alrededor de los CpG. Se verifica variabilidad en las señales de las reacciones entre pacientes

Tabla No.6. Análisis de frecuencia entre pacientes y controles.

	Estado de metilación	
	M/U	U/U
Pacientes	14 (100%)	0 (0.0%)
Controles	10 (76.92%)	3 (23.07%)
* $\chi^2_c = 3.63, p=0.05667$		

En ratones knock-out para el gen de la ataxina-2, se observan alteraciones en el metabolismo lipídico pero no un cuadro neurológico (Kiehl et al., 2006). Por el contrario, en el caso de personas homocigóticas se evidencia un aumento de la severidad de la enfermedad (Almaguer et al., 2008).

Extrapolando los resultados anteriores a los obtenidos en este trabajo, se podría proponer que a consecuencia de una menor eficiencia o pérdida de función de la ataxina-2 nativa producida por la metilación del alelo normal en pacientes con SCA2, se producirá un aumento de la severidad de la enfermedad, dependiente del nivel de metilación y en la que el detrimento de la capacidad de respuesta celular ante el estrés, conjuntamente con las alteraciones del metabolismo lipídico, podrían ser algunas de las causas. Por el contrario, la metilación del alelo patológico conduciría a una disminución de la severidad de la expresión clínica como consecuencia de la reducción en la concentración de la ataxina-2 mutada, que igualmente sería dependiente del nivel de metilación.

La presencia de un alelo metilado y uno sin metilar en el 100 % de los pacientes, si se analiza la posible repercusión del hecho sobre el cuadro clínico de la SCA2, pudiera constituir una evidencia de la veracidad de la hipótesis de Bauer y colaboradores (2004). En otras palabras, que la metilación *de novo* pudiera ser un mecanismo de autodefensa celular dirigido a mitigar el daño causado por la ataxina-2 mutada y que además podría constituir una fuente importante de variabilidad fenotípica en la SCA2.

El hecho de que en los controles apareciera la combinación M/U en el 77 % de los casos estudiados es una evidencia de que la técnica es lo suficientemente sensible como para reconocer los niveles basales de metilación que caracteriza a la población en sentido general. Este resultado es muy trascendente debido a que ha sido corroborado que la sobre-expresión de las variantes normales de los genes *Atxn1*, *Atxn2*, *Atxn3*, *Atxn7*, *It15*, induce un efecto neurotóxico, aunque en menor grado si se compara con su variante mutada. Ello implica que estos genes en su estado fisiológico están sometidos a un estricto control de su expresión, no sólo para garantizar una correcta economía celular, sino por el propio carácter

tóxico de las proteínas codificadas por estos (Huynh et al., 1999; Fernández et al., 2000; Nonhoff et al., 2007).

Ha sido observado que en pacientes SCA2 los niveles de ataxina son mayores que en controles (individuos sanos no portadores de la mutación) y pacientes con Alzheimer; además que estos aumentan con el tiempo en ambos grupos (Huynh et al., 1999). Elevados niveles de ataxina-2 normal y expandida interfieren con la capacidad de la célula de contrarrestar el daño oxidativo o el estrés ambiental (Nonhoff et al., 2007).

La técnica desarrollada no permite dilucidar sobre cual de las formas alélicas está ocurriendo la metilación, estudiar aquellos casos en los que la región promotora no está totalmente metilada, así como realizar un análisis cuantitativo del estado de metilación; constituyendo aspectos limitantes de la misma. Sin embargo, las diferencias en el patrón de metilación en pacientes con igual nivel de mutación, con una mayor señal en el alelo expandido, sugieren que la metilación está asociada al alelo patológico (Bauer et al., 2004). Pudiendo proponerse que la célula reconoce el daño tóxico y trata de apagarlo mediante metilación *de novo*.

Estudios realizados en el CIRAH han demostrado que a medida que aumenta el número de trinucleótido CAG en los alelos normales aumenta su capacidad protectora ante el efecto tóxico de la proteína (Antoine, 2007). Por otro lado, el aumento de la secuencia repetitiva poliglutamínica en las ataxinas potencia su interacción con el factor transcripcional Sp1, que constituye un modulador de los patrones de metilación de secuencias promotoras al evitar la metilación de los islotes CpG (Suske, 1999).

Desde nuestro punto de vista, ambos aspectos, y el hecho de haberse demostrado en el estudio bioinformático que el promotor presentaba una sobre representación de motivos de unión para el factor de transcripción Sp1, constituyen evidencias indirectas de que efectivamente la metilación *de novo* ocurre sobre el alelo mutado y no sobre el normal. La existencia de ataxina-2 normal, pero con secuencias poliglutamínicas largas, en conjunto con la proteína mutada propician el secuestro del factor Sp1 y por ende la metilación de sitios CpG que en su presencia no hubieran sido metilados, lo que al parecer tiene lugar predominantemente en los

alelos mutados, de lo contrario el efecto de los alelos largos no sería de protección sino de potenciación del cuadro clínico neurológico.

Los resultados discutidos corroboran la utilidad y aplicabilidad de la MSP a la investigación de la metilación *de novo* en la SCA2 como una nueva arista para entender la fisiopatología de la enfermedad y generar tratamientos racionales; así como el mejoramiento del asesoramiento genético de los pacientes SCA2.

Es evidente, por tanto, que la MSP será una herramienta invaluable para la estratificación de los pacientes y en la generación de estrategias terapéuticas para una enfermedad huérfana de tratamiento a escala mundial. Sin embargo, es imprescindible su concepción bajo nuevos principios que permitan solucionar sus limitantes, como podría ser la incorporación de nuevos aspectos para la identificación de la variante alélica que es objeto de regulación mediante la metilación de su región promotora, una de sus principales problemas.

IV. CONCLUSIONES.

- El promotor del gen *Atxn2* presenta características estructurales que permiten, a través de la metilación, un estricto y dinámico control de la síntesis de ataxina-2.
- Los oligonucleótidos diseñados y sintetizados, dado su alto nivel de sensibilidad y especificidad, posibilitan un análisis preciso del estado de metilación del promotor del gen *Atxn2*.
- Los oligonucleótidos diseñados para reconocer secuencias completamente metiladas, bajo las condiciones experimentales establecidas como óptimas, en comparación con los utilizados para secuencias no metiladas admiten hacer un más eficiente análisis del estado de metilación, producto de su mayor nivel de sensibilidad.
- Bajo las condiciones experimentales establecidas como óptimas para la amplificación, la ocurrencia de reacciones inespecíficas (formación de dímeros de oligonucleótidos) no influye de forma significativa en los resultados obtenidos mediante la MSP.
- Las variantes analíticas de la MSP desarrollada son adecuadas para estudiar el patrón de metilación de la región promotora del gen *Atxn2*, además aportan datos que permiten esclarecer el papel de este factor epigenético en la expresión clínica de la SCA2.
- Fue demostrado cualitativamente que el estado de metilación de la región promotora pudiera afectar la expresión del gen y la expresión clínica de la SCA2.

V. RECOMENDACIONES.

- Concepción de la técnica bajo nuevos principios que permitan la identificación de la variante alélica que es objeto de regulación mediante la metilación de la región promotora, eliminando así las limitaciones de la técnica propuesta.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Affaitati A, Cristofaro T, Feliciello A, Varrone S. Identification of alternative splicing of spinocerebellar ataxia type 2 gene. *Gene* 2001; 267: 89-93.
- Aguiar J, Fernández J, Aguilar A, Mendoza Y, Vázquez M, Suárez J, Berlanga J, Cruz S, Guillén G, Herrera L, Velázquez L, Santos N, Meriño N. Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neuroscience Letters* 2006; 392(3): 202-206.
- Aguiar J, Santurlidis S, Nowok J, Alexander C, Rudnicki D, Gispert S, et al. Identification of the physiological promoter for spinocerebellar ataxia 2 gene reveals a CpG island for promoter activity situated into the exon 1 of this gene and provides data about the origin of the nonmethylated state of these types of islands. *BBRC* 1999; 254(2): 315-8.
- Albrecht M, Golatta M, Wullner U, Lengauer T. Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur. J. Biochem* 2004; 271: 3155-3170.
- Alluri RV, Komandur S, Wagheray A, Chaudhuri JR, Sitajayalakshmi, Meena AK, Jabeen A, Chawda K, Subhash K, Krishnaveni A, Hasan Q. Molecular analysis of CAG repeats at five different spinocerebellar ataxia loci: correlation and alternative explanations for disease pathogenesis. *Mol Cells* 2007; 24(3): 338-42.
- Almaguer GD, Laffita MJ, González ZY, Almaguer ML, Sánchez CG, Mejías BS, Velázquez PL. Ataxin-2 self polyQ load underlies the antioxidant impairment in SCA2. *Free Radical Medicine and Biology* 2009; Manuscript No.: FRBM-D-10-00033.
- Almaguer ML, Almaguer DG, González YZ, Martínez GE, Bahr VP. Capacidad antioxidante total en pacientes cubanos con Ataxia Espinocerebelosa tipo2. *Rev Mex Neuroci* 2005; 6(3): 2001-2006.
- Almaguer ML, Falcón NS, Almira YR, Zaldivar YG, Almarales DC, Góngora EM, Herrera MP, Batallán KE, Armiñán RR, Manresa MV, Cruz GS, Laffita-Mesaa J,

- Cyuz TM, Chang V, Auburger G, Gispertb S and Pérez LV. Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. *Clin Genet* 2010. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01358.x.
- Almaguer ML, González YZ, Almaguer DG, Laffita JM, Cuello DA. Efecto de la “dosis genética” sobre el fenotipo clínico en enfermedades poliglutamínicas. *Correo Científico Médico de Holguín* 2008; 12(3).
- Anderson JH, Christova PS, Xie T, Schott KS, Ward K, Gomez CM. Spinocerebellar Ataxia in Monozygotic Twins. *Arch Neurol* 2002; 59: 1945-1951.
- Antoine D. Trabajo de Diploma en opción al título de Licenciado en Biología: “Interacción alélica en la determinación del fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2”. *Universidad de Oriente. (Dpto. de Biología)*. Año 2007.
- Azhikina TL, Sverdlov ED. Study of Tissue-Specific CpG Methylation of DNA in Extended Genomic Loci. *Biochemistry (Moscow)* 2005; 70(5): 596-603.
- Bauer PO, Zumrova A, Matoska V, Mitsui K, and Goetz P. ¿Can ataxin-2 be down-regulated by allele-specific de novo DNA methylation in SCA2 patients?. *Med. Hypotheses* 2004; 63(6): 1018-23.
- Bhasin M, Zhang H, Reinherz E, Reche P. Prediction of methylated CpGs in DNA sequences using a support vector machina. *FEBS Letters* 2005; 579(20): 4302-4308.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1): 6-21.
- Brandes JC, Carraway H, Herman JG. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene* 2007; 26: 6229-6237.
- Brena RM, Hui-Ming TH, Plass C. Quantitative assessment of DNA methylation: potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. *J Mol Med* 2006; 84: 365–377.
- Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, et al. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of

- spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol* 2004; 61(5): 727-33.
- Burk K, Globas C, Bosch S, Grabber S, Abele m, Brice A, Dichgans J, Daum I, Klockgether T. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 2. *Brain* 1999; 122: 769-777.
- Buryanov YI, Shevchuk TV. DNA Methyltransferases and Structural–Functional Specificity of Eukaryotic DNA Modification. *Biochemistry* 2005; 70(7): 730-742.
- Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum. Mol. Genet* 2006; 15(1): R95-R10.
- Cancel G, Durr A, Didierjean O, et al. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: A study of 32 families. *Hum. Mol. Genet* 1997; 6: 709-715.
- Carotti D, Funicello S, Palitti F, Strom R. Influence of preexisting methylation on the novo activity of eukaryotic DNA methyltransferase. *Biochemistry* 1998; 37(4): 1101-1108.
- Chattopadhyay B, Ghosh S, Gangopadhyay PK, Das SK, Roy T, Sinha KK, et al. Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci Lett* 2003; 345(2): 93-6.
- Ciosk R, DePalma M, Priess JR. ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. *Development* 2004; 131: 4831-4841.
- Cleary JD, Pearson CE. The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet Genome Res* 2003; 100(1-4): 25-55.
- D'Esposito M, Quaderi NA, Ciccodicola A, Bruni P, Esposito T, D'Urso M, et al. Isolation, physical mapping, and Northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm. Genome* 1996; 7: 533-535.
- Derks S, Lentens M, Hellebrekers D, de Bruïne AP, Herman JG and Engeland M. Methylation-specific PCR unrevealed. *Cellular Oncology* 2004; 26: 291-299.

- Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *Genome Res* 1993; 3: S30-S37.
- Farré D, Bellora N, Mularoni L, Messeguer X, Mar MA. Housekeeping genes tend to show reduced upstream sequence conservation. *Genome Biology* 2007; 8: R140.
- Fernández M, McClaim ME, Martínez RA, Show K, Lipe H, ravits J, Bird TD, La Spada AR. Late-onset SCA2: 33 CAG repeats are sufficient to cause disease. *Neurology* 2000; 55(4): 569-572.
- Fleming J, Huang T, Ewart AT. The Role of Parental and Grandparental Epigenetic Alterations in Familial Cancer Risk. *Cancer Res* 2008; 68(22): 9116-21.
- Gispert S, Lunkes A, Santos N, Orozco G, Ha-Hao D, Ratzlaff T, et al. Localization of the candidate gene D-amino acid oxidase outside the refined 1 cM Region of Spinocerebellar Ataxia 2. *Am.J. Hum.Genet* 1995; 57: 972-975.
- Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, et al. Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23.24.1. *Nature Genet* 1993; 4: 295-299.
- Globas C, du Montcel ST, Baliko L, Boesch S, Depondt C, DiDonato S, Durr A, Filla A, Klockgether T, Mariotti C, Melegh B, Rakowicz M, Ribai P, Rola R, Schmitz-Hubsch T, Szymanski S, Timmann D, Van de Warrenburg BP, Bauer P, Schols L. Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6. *Mov. Disord* 2008; 23(15): 2232-8.
- González AR, Díaz AM, Díaz AA. La epigenética y los estudios en gemelos en el campo de la psiquiatría. *Salud mental* 2008; 31: 229-237.
- Grace MG, Bestor TH. Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem* 2005; 74: 481-514.
- Graham RK, Slow EJ, Deng Y, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Leavitt BR, Raymond LA and Hayden MR. Levels of mutant huntingtin influence the phenotypic severity of Huntington disease in YAC128 mouse models. *Neurobiology of Disease* 2006; 21(2): 444-455.

- Gunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 13e65.
- Hayatsu H, Negishi K, Shiraishi M, Tsuji K, Moriyama K. Chemistry of bisulfite genomic sequencing; advances and issues. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2007; 51: 47-8.
- Herman J, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin BS. Methylation-specific PCR: A novel assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1996; 93: 9821-9826.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med* 2003; 349: 2042-2054.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci* 2004; 117: 5965-5973.
- Hirst M, Marra MA. Epigenetics and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41: 136-146.
- Hiushan Ng, Pulst SM, Huynh Duong P. Ataxin-2 mediated cell death is dependent on domains downstream of the polyQ repeat. *Exp Neurol.* 2007; 208(2): 207-215.
- Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR. Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucl. Acids Res* 2008; 36(9): 2825-2837.
- Huynh DP, Del Bigio MR, Ho DH, Pulst SM. Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann. Neurol* 1999; 45: 232-241.
- Huynh DP, Yang HT, Vakharia H, Nguyen D, Pulst SM. Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum. Mol. Genet* 2003; 12(13): 1485-96.
- Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier J-M, et al. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nature Genet* 1996; 14: 285-291.
- Irminger-Finger I. Science of Cancer and Aging. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25(14): 1844-1851.

- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & Dev* 2005; 19: 104 -113.
- Kaplan S, Itzkovitz S, Shapiro E. A universal mechanism ties genotype to phenotype in trinucleotide diseases. *PLoS Comput Biol* 2007; 3(11): e235.
- Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society* 2000; 30(6): 963-969.
- Keverne EB, Curley JP. Epigenetics, brain evolution and behaviour. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 398-412.
- Kiehl TR, Nechiporukb A, Figueroaa KP, Keatingb MT, Huynha DP, Pulst SM. Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 339(1): 17-24.
- Kiehl TR, Shibata H, Pulst SM. The ortholog of human ataxin-2 is essential for early embryonic patterning in *C. elegans*. *J. Mol. Neurosci* 2000; 15: 231-241.
- Kim JM, Hong S, Pyoung GK, Jae YC, Kyeong YK, Sup PS, Eun KS, JeonBS. Importance of Low-Range CAG Expansion and CAA Interruption in SCA2 Parkinsonism. *Arch Neurol* 2007; 64(10): 1510-1518.
- Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *The J. Nutr. Biochemistry* 2009; 20(12): 917-926.
- Kishi N, Macklis JD. Dissecting MECP2 Function in the Central Nervous System. *JCN* 2005; 20(9): 753-759.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *TiBS* 2006; 31(2): 89-97.
- Kunkel LM, Smith KD, Boyer SM, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OS, et al. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Nat Acad Sci USA* 1977; 74: 1245-1249.
- Lastres-becker I, Rub U, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *The Cerebellum* 2008; 7(2): 115-24.

- Le-Pira F, Zappalà G, Saponara R, Domina E, Restivo D, Reggio E, Nicoletti A, Giuffrida S. Cognitive findings in spinocerebellar ataxia type 2: relationship to genetic and clinical variables. *J. Neurol Sci* 2002; 201(1-2): 53-7.
- Leznicki P. Aggregation and toxicity of the proteins with polyQ repeats. *Postepy Biochem* 2005; 51(2): 215-22.
- Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18: 1427-1431.
- Li LC. Designing PCR primer for DNA methylation mapping. *Methods Mol Biol* 2007; 402: 371-84.
- Libby RT, Hagerman KA, Pineda VV, Lau R, Cho DH, Baccam SL, Axford MM, Cleary JD, Moore JM, Sopher BL, Tapscott SJ, Filippova GN, Pearson CE, La Spada AR. CTCF cis-Regulates Trinucleotide Repeat Instability in an Epigenetic Manner: A Novel Basis for Mutational Hot Spot Determination. *PLoS Genet* 2008; 4(11): e1000257.
- Mao R, Aylsworth AS, Potter N, Wilson WG, Breningstall G, Wick MJ, et al. Childhood-onset ataxia: testing for large CAG-repeats in SCA2 and SCA7. *Am J Med Genet* 2002; 110(4): 338-45.
- Martin GM. Modalities of gene action predicted by the classical evolutionary biological theory of aging. *Ann. N Y Acad Sci* 2007; 1100: 14-20.
- Mederos LE; Proenza CL; Almira YR; Batallán KE; Falcón NS; Góngora EM; Almarales DC; Pérez LV; Herrera MP. Age-dependent risks in genetic counseling for spinocerebellar ataxia type 2. *Clinical Genetics* 2008; 74 (6): 571-3.
- Moretti P, Blazo M, Garcia L, Armstrong D, Lewis RA, Roa B, Scaglia F. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) presenting with ophthalmoplegia and developmental delay in infancy. *Am. J. Med. Genet* 2004; 124A: 392-396.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet* 2005; 14(1): R47-R58.
- Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389.

- Nathan M, Fox DK. Acetylated bsa increases the sensitivity of RT-PCR with low levels of RNA. *FOCUS* 1997; 19(3): 50.
- Nechiporuk T, Huynh DP, Figueroa K, Sahba S, Nechiporuk A, Pulst SM. The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression. *Hum Mol Genet* 1998; 7(8): 1301-1309.
- Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia L. Activity-Dependent Suppression of Miniature Neurotransmission through the Regulation of DNA Methylation. *The Journal of Neuroscience* 2008; 28(2): 395-406.
- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, Lehrach H, Krobitsch S. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell* 2007; 18(4): 1385-96.
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* 2001; 17: 520-527.
- OIE: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Office International Des. Epizooties 2004, Chapter 1.1.4. pp: 1-10. Disponible on line: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e_summry.htm. Mayo, 2009.
- Pearson CE, Nichol KE, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Genetic* 2005; 6: 729-742.
- Practical Molecular Biology, 2003; Promega Technical Bulletin: PCR Core Systems. Instructions for use of products M7660 and M7665. 2005. Disponible on line: www.promega.com/tbs/tb254/tb254.html. Mayo, 2009.
- Prestridge DS. Predicting Pol II Promoter Sequences Using Transcription Factor Binding Sites. *J. Mol. Biol* 1995; 249: 923-32.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X-N, Lopes-Cendes I, et al. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet* 1996; 14: 269-276.

- Pulst SM, Santos N, Wang D, Yang H, Huynh D, Velázquez L, Figueroa K. Spinocerebellar ataxia type 2: PolyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* 2005; 128(10): 2297-303.
- Pulst SM. Spinocerebellar ataxia. In: Pulst SM, editor. *Genetics of Movement Disorders*. San Diego: Academic Press 2003; 47-53.
- Qiagen® Product Guide. Epigenetics sample and assay technology. 2009: 46
- Raizis AM, Schmitt F, Jost JP. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Analytical Biochemistry* 1995; 226: 161-166.
- Ralser M, Albrecht M, Nonhoff U, Lengauer T, Lehrach H, Krobitsch S. An Integrative Approach to Gain Insights into the Cellular Function of Human Ataxin-2. *J. Mol. Biol* 2005; 346: 203-214.
- Ramocki MB, Chapieski L, McDonald RO, Fernandez F, Malphrus Amy D. Spinocerebellar Ataxia Type 2 Presenting With Cognitive Regression in Childhood. *JCN* 2008; 23: 999.
- Riverón GF. Ataxia Espinocerebelosa tipo 2: Características clínicas, genéticas y mecanismos patogénicos. *Rev Cubana Genet Comunit* 2008; 2(2): 7-15.
- Robertson KD, Kim TY and Zhong S. Epigenomic profiling reveals novel targets of aberrant DNA methylation in brain tumors. *Proc. Amer Assoc Cancer Res* 2006; 47.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597–610.
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174(3): 341-348.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 2005; 345: 139.
- Rub U, Del Turco D, Del Tredici K, De Vos RA, Brunt ER, Reifenberger G, et al. Thalamic involvement in a spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) and a spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patient, and its clinical relevance. *Brain* 2003; 126: 2257-2272.
- Ryu H, Lee J, Olofsson BA, Mwidau A, Dedeoglu A, Escudero M, Flemington E, Azizkhan-Clifford J, Ferrante RJ, Ratan RR. Histone deacetylase inhibitors

- prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *PNAS* 2003; 100(7): 4281-4286.
- Sachs MS, Geballe AP. Downstream control of upstream open reading frames. *Genes Dev* 2006; 20: 915-921.
- Sahba S, Nechiporuk A, Figueroa KP, Nechiporuk T, Pulst SM. Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1. *Genomics* 1998; 47: 359-364.
- Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, et al. Identification of the Spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nature Genet* 1996; 14: 277-284.
- Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 2004; 127: 643-651.
- Santos N, Aguiar J, Fernández J, Vázquez M, Auburger J, Gispert S, et al. Diagnóstico molecular de una muestra de la población cubana con ataxia espinocerebelosa tipo 2. *Biotech Apl* 1999; 16(4): 219-22.
- Satterfield TF, Jackson SM, Pallanck LJ. A *Drosophila* homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics* 2002; 162: 1687-1702.
- Satterfield TF, Pallanck LJ. Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 2006; 15(16): 2523-32.
- Schneider R, Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 2007; 21: 3027-3043.
- Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol* 2002; 4(5): E131-6.
- Shibata H, Huynh DP, Pulst SM. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Hum. Mol. Genet* 2000; 9: 1303-1313.
- Sinden RR, Potaman VN, Oussatcheva EA, Pearson CE, Lyubchenko YL and Shlyakhtenko LS. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. *J. Biosci* 2002; 27(1): 53-65.

- Smith SS, Kan JLC, Baker DJ, Kaplan BE, Dembek P. Recognition of unusual DNA structures by human DNA (cytosine-5) methyltransferase. *J. Mol. Biol* 1991; 217(1): 39-51.
- Sobczak K, Krzyzosiak WJ. CAG Repeats Containing CAA Interruptions Form Branched Hairpin Structures in Spinocerebellar Ataxia Type 2 Transcripts. *J. Biol. Chem* 2005; 280(5): 3898-3910.
- Sobczak K, Krzyzosiak WJ. Patterns of CAG repeat interruptions in SCA1 and SCA2 genes in relation to repeat instability. *Hum Mutat* 2004; 24: 236-247.
- Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 1999; 238: 291-300.
- Swales AK, Spears N. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction* 2005; 130: 389-399.
- Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA Methylation Analysis by MethyLight Technology. *Methods* 2001; 25: 456-462.
- Turker MS. The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cell. *Semin Cancer Biol* 1999; 9(5): 329-337.
- Tusnády GE, Simon I, Váradi A, Arányi T. BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucl. Acids Res* 2005; 33(1): 1-6.
- Vaissiére T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research* 2008; 659: 40-48.
- van de Loo S; Eich F; Nonis D; Auburger G; Nowock J. Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum. *Experimental Neurology* 2009; 215 (1): 110-8.
- van de Warrenburg BC, Hendriks H, Dürr A, van Zuijlen M, Stevanin G, Camuzat A, Sinke R, Brice A, Kremer BH. Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: A study in a Dutch-French cohort. *Annals of Neurology* 2005; 57(4): 505 -512.
- Velázquez LP, Sánchez GC, Santos NF, Almaguer LM, Escalona KB, Rodríguez RL, Paneque MH, Laffita JM, Rodríguez JD, Aguilera RR, González YZ, Coello DA, Almaguer DG and Humberto JC. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguin. *Neuroscience Letters* 2009; 454(2): 157-160.

- Viscomi MT, Florenzano F, Amadio S, Bernardi G, Molinari M. Partial resistance of ataxin-2-containing olivary and pontine neurons to axotomy-induced degeneration. *Brain Res Bull* 2005; 66: 212–221.
- Whitelaw NC, Whitelaw E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Human Molecular Genetic* 2006; 15(2): R131-R137.
- Wiedemeyer R, Westermann F, Wittke I, Nowock J, Schwab M. Ataxina-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cell. *Oncogene* 2003; 22: 401-411.
- Wigler M, Levy D, Perucho M. The somatic replication of DNA methylation. *Cell* 1981; 24: 33-40.
- Wojdacz TK, Hansen LL. Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *Biotechniques* 2006; 41: 274-178.
- Wojdacz TK, Lotte LH, Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Research Notes* 2008; 1: 54.
- Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Bruce RW. The Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *DNA and Cell Biology* 1991; 10(3): 233-238.
- Ying SH; Choi SI; Perlman SL; Baloh RW; Zee DS; Toga AW. Pontine and cerebellar atrophy correlate with clinical disability in SCA2. *Neurology* 2006; 66(3): 424-6.
- Zilberman DI, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 2007; 134: 3959-3965.

ANEXOS.

Anexo No.1. Enfermedades humanas causadas por expansiones de secuencias repetitivas de CAG/CTG localizadas en regiones codificadoras de genes noveles.

Enfermedad	Locus	Tamaño de la secuencia de CAG/CTG		Producto del Gen	Principales dianas patológicas	Herencia	OMIM No.
		Normal	Expandido				
SCA1	6p22-p23	6-36	40-83	Ataxina-1	Tracto espinocerebeloso, núcleo dentado, oliva inferior y células de Purkinje.	AD	164400
SCA2	12q24.1	13-31	32-500	Ataxina-2	Células de Purkinje, núcleo pontino y el núcleo de la oliva inferior.	AD	183090
SCA3	14q24.3-q32	12-33	54-200	Ataxina-3	Sistema subtálamo-pálido y la columna intermedia.	AD	109150
SCA6	19p13.1-13.2	4-20	21-33	Subunidad α 1 ^a -de un canal de calcio dependiente de voltaje (CACNA1A)	Células de Purkinje de la capa intermedia de la corteza del cerebelo.	AD	183086
SCA7	3p21.1-p12	4-35	37-200	Ataxina-7	Células de Purkinje, núcleo dentado y la oliva inferior.	AD	164500
SCA12	5q31-q33	6-26	66-78	PPP2R2B	Atrofia cortical y cerebelosa en estudios de MRI o CT.	AD	604326
SCA17	6p27	35-42	50-63	Proteína de unión a TATA (TBP)	Núcleo caudado, putamen y células de Purkinje.	AD	600075
SBMA	Xq11-q12	11-24	40-62	Receptor de andrógeno (AR)	Motoneuronas.	Recesivo ligado al cr. X.	313200
DRPLA	12p12	7-25	49-88	Atrofia	Sistemas dentatorubral y palidolusiano.	AD	125370
HD	4p16.3	6-34	36--250	Huntingtina (htt)	Núcleo caudado y putamen.	AD	143100
HDL-2	16q24.3	6-28	≥41	Junctofilina-3	Estriado y corteza cerebral.	AD	605268

Anexo No.2. Características de las isoformas descritas para la ataxina-2 humana y de ratón.

Isoforma	Tipo	pb	Producto		Expresada en	Comentario	Referencia
			kDa	AA			
I	Completa	3936	140	1312	Encéfalo, médula espinal, cerebelo, corazón y placenta.	Forma completa	Pulst et al., 1996
II	Por empalme	3726	129	1242	Encéfalo, médula espinal, cerebelo, corazón, placenta, células T y macrófagos.	Carece del exón 10	Sahba et al., 1998
III	Por empalme	3543	122,8	1181	Todos los tejidos de ratón menos el muscular.	Carece de los exones 10 y 11	Nechiporuk et al., 1998
IV	Por empalme	3882	137,9	1294	Encéfalo, médula espinal, cerebelo, corazón y placenta.	Carece del exón 21	Affaitati et al., 2001

Anexo No.3. Consentimiento Informado para participar en el proyecto de investigación para la identificación de factores epigenéticos modificadores de la edad de inicio en pacientes con ataxia espinocerebelosa tipo 2.

Yo, _____, vecino de _____, estoy plenamente de acuerdo con participar en el proyecto de investigación para la identificación de factores epigenéticos modificadores de la edad de inicio en pacientes con ataxia espinocerebelosa tipo 2. Conozco que existe la Clínica para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias, y que por los logros obtenidos de las investigaciones en temas de Genética Molecular, se avanza en el conocimiento de la enfermedad que existe en mi familia, lo que provocará un importante beneficio para mis descendientes y para mí.

Por las informaciones que he recibido, sé que las pruebas que me realizarán consisten en una extracción de sangre que no me causará ningún daño o perjuicio, y que se utilizarán los datos de mi historia clínica.

Estos resultados no serán diagnósticos sino investigativos, pero con los mismos ayudaré al conocimiento de la enfermedad que padezco y que presentan otros de mis familiares. Estos no serán revelados a ninguna persona aunque esta pertenezca a mi familia, a menos que yo manifieste de manera oral y escrita mi deseo de que se conozca. Por tanto, estoy de acuerdo en que los resultados de la investigación serán estrictamente confidenciales.

Afirmo y confirmo que mi participación es absolutamente voluntaria. He sido informado de todo lo relacionado con los fines de tales estudios. Si decido abandonar la investigación esto no influirá de ninguna manera en la asistencia médica multidisciplinaria que recibo por los especialistas de la institución.

Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero no así la identidad de ninguno de los pacientes participantes.

Yo he tenido la oportunidad de hacer todas las preguntas que he deseado sobre el estudio y, por tanto, estoy de acuerdo en participar para lo cual doy fe firmando éste documento. Cuento con las vías necesarias y suficientes para establecer comunicación con la Clínica para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias

Hereditarias, y con los profesionales a cargo de la ejecución del proyecto, en el transcurso de la investigación.

Fecha: _____.

Hora: _____.

Lugar:

_____.

Participante: _____.

Testigo: _____.

Miembro del Proyecto: _____.

Anexo No.4. Secuencia genómica de la región promotora del gen *Atxn2* amplificada por los M y U.

5'tccgactt**ccgg**taaagagtcctatccgcacctccgctcccac**ccgg**cgccctcgg**cgcg**cccgcctccgat
gcgctcagcggccgcagctcctcggagtc**cgcg**gtggccaccgagctcgcgccttcgccgcagccaggtg
ccgggt-3'

Alelo metilado

5'tt**cg**attt**cg**gtaaagagttttatt**cg**tattt**cg**ttttatt**cg**gcgtt**cg****cg**tt**cg**tttt**cg**atg**cg**tttagc
ggtcgtagtttt**cg**gagtt**cg****cg**gtggttat**cg**agtt**cg**tcgtt**cg**tcgtagtaggtggt**cg**gg-3'

Alelo no metilado

5'tttgattttggtaaagagttttattgtattttgtttttatttggtggtttggtggtttttgatgtgtagtggttagttt
ttggagtttgggtggtattgagttttgtttgttagtaggtggtttgggt-3'

cgcg :Sitios de restricción para BsTUI.

ccgg : Sitios de restricción para HpaII/MsPI.