

CASOS PRÁCTICOS

CASO 1

Varón de 41 años remitido al servicio de Neurología por presentar agarrotamiento de manos y facies típica de DM1. Le cuesta andar y arrastra un poco los pies. Entre los antecedentes familiares no existe una historia familiar clara de DM1, salvo un hermano con diabetes y cataratas. Su madre ha fallecido. En el electromiograma se observa un patrón miopático con abundantes descargas miotónicas en todos los músculos explorados. Se solicita estudio genético de DM1.

La DM1 o enfermedad de Steinert es una enfermedad autosómica dominante causada por la expansión del microsatélite (CTG)_n localizado en la región 3'UTR del gen *DMPK*.

El estudio genético se realizó mediante las técnicas de PCR de microsatélites y TP-PCR:

1. Análisis del microsatélite (CTG)_n localizado en la región 3'UTR del gen *DMPK* (Figura 6). Protocolo PCR: *Master Mix* (Promega®) (12,5 µl), H₂O (10µl), Primer P1 *forward* con FAM (P1F-FAM) 20ng/µL (1µl), Primer P2 *reverse* con HEX (P2R-HEX) 20ng/µL (1µl), DNA 100-200ng/µL (1µl).
2. Análisis mediante TP-PCR bidireccional de la región 3'UTR del gen *DMPK* (Figura 7). Protocolo TP-PCR *forward* (F) o *reverse* (R): Agua (4µl), Mezcla de cebadores F o R* (3µl), DMSO (2,5µl), *Master Mix* (Promega®) (2,5µl), DNA 100-200ng/µL (1µl).

*Mezcla de cebadores F: P1F-FAM (20ng/µL), P3 (20ng/µL), P4CAG-R (2ng/µL) (10:10:1).

*Mezcla de cebadores R: P2R-HEX (20ng/µL), P3 (20ng/µL), P4CTG-F (2ng/µL) (10:10:1).

CONDICIONES PCR y TP-PCR:

- 1 Clico 94° 1´
 - 34 Ciclos 94° 1´, 60° 1´, 72° 2´
 - 1 Ciclo 72° 10´
-

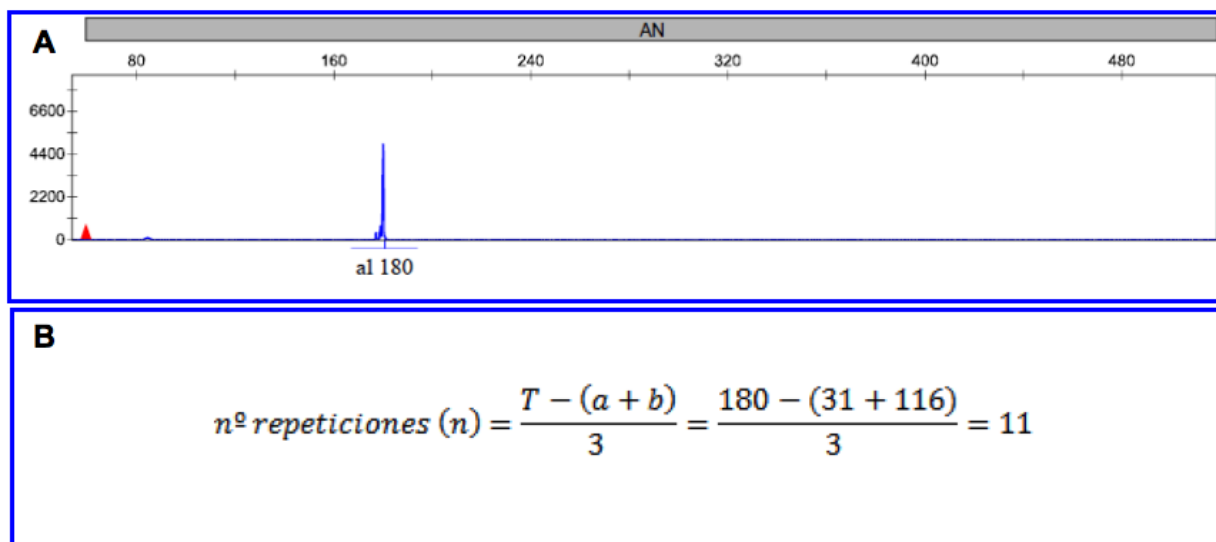


Figura 6: Resultado del estudio de microsatélites en el paciente. A) Se observa un único pico con un tamaño de 180 nucleótidos. B) Según la fórmula el tamaño del pico obtenido equivale a 11 (180-147/3) repeticiones CTG (intervalos de referencia: 5-35 rep (normal); 36-50 rep (inestable); >50 rep (patológico)).

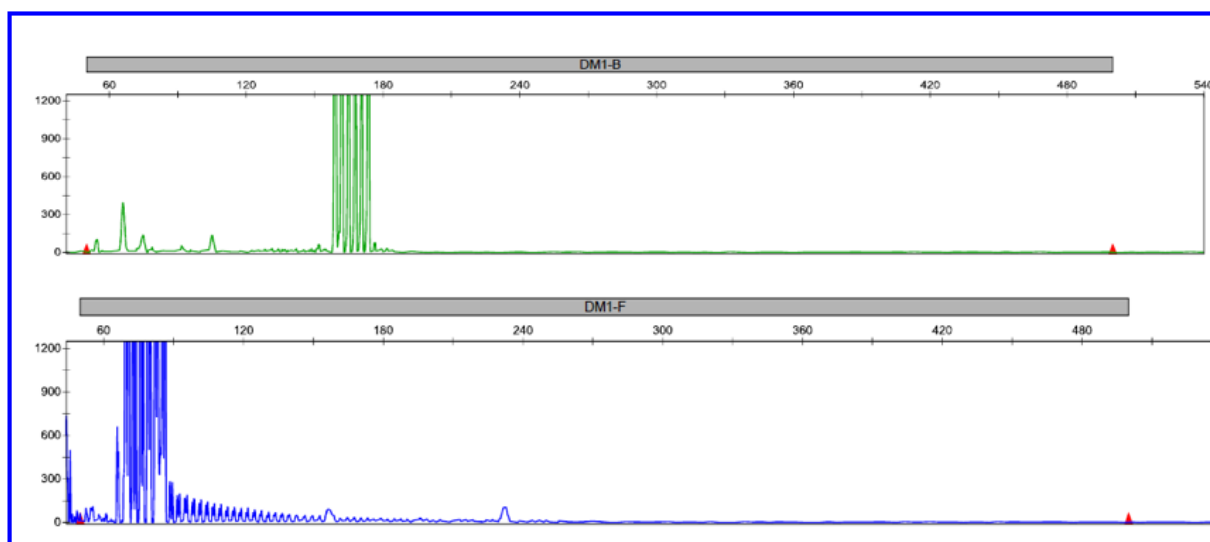


Figura 7: Resultado de la técnica de TP-PCR del paciente. Arriba) Resultado de la TP-PCR reverse: no se observa expansión de repeticiones CTG en la región 3'UTR del gen *DMPK*. Abajo) Resultado de la TP-PCR forward: se observa expansión de repeticiones CTG en la región 3'UTR del gen *DMPK*.

Los resultados indican que el paciente es heterocigoto para un alelo normal de 11 repeticiones CTG y para uno expandido de más de 100 repeticiones en la región 3'UTR del gen *DMPK* (las repeticiones CTG presentan interrupciones que no permiten detectar la expansión con la TP-PCR reverse). Este resultado confirma el diagnóstico de DM1.

CASO 2

Varón de 32 años que refiere inestabilidad de la marcha y temblor desde los 20 años, que ha presentado dificultades para realizar ciertas actividades en consonancia con la edad, desde

la primera adolescencia. Actualmente, en estudio y seguimiento por el servicio de Neurología. En la exploración se observa seguimiento ocular sacádico, hipotonía generalizada con arreflexia universal, pie ligeramente excavado, con ligera escoliosis e hipopalestesia (disminución de la sensación vibratoria) leve en pies. Por otro lado, también se observa dismetría, disdiadococinesia, disartria e inestabilidad postural y de la marcha con ligero aumento de la base de sustentación.

En la analítica las determinaciones de vitaminas A y E, alfafetoproteína, cobre y ceruloplasmina, anticuerpos antitransglutaminasa IgA y anti-GAD65 son normales. En la resonancia magnética se observó una atrofia cerebelosa global prominente y de médula cervical. En el estudio de otoneurología se informaron signos de disfunción cerebelosa: audiometría normal. Sistema oculomotor horizontal y vertical con sacadas con hipermetrías, seguimiento atáxico-sacádico. El electrocardiograma fue normal y electromiograma con polineuropatía axonal crónica.

Se sospechó inicialmente ataxia de Friedreich, que se había descartado previamente mediante estudio genético en otro centro.

Actualmente, el diagnóstico es ataxia cerebelosa con polineuropatía axonal asociada.

Las ataxias espinocerebelosas (SCA) más frecuentes se caracterizan por presentar expansiones de repeticiones CAG en regiones codificantes de los genes *ATXN1* (en la SCA1), *ATXN2* (en SCA2), *ATXN3* (en SCA3), *CACNA1A* (en SCA6) y *ATXN7* (en SCA7). Por este motivo, se realiza el estudio molecular de estas ataxias espinocerebelosas de herencia autosómica dominante, mediante PCR y TP-PCR.

El paciente presenta valores de repeticiones CAG dentro de los rangos normales en los genes *ATXN1*, *ATXN3*, *CACNA1A* y *ATXN7*. Sin embargo, el análisis de microsatélites del gen *ATXN2* en el paciente, presentó los siguientes resultados (figura8):

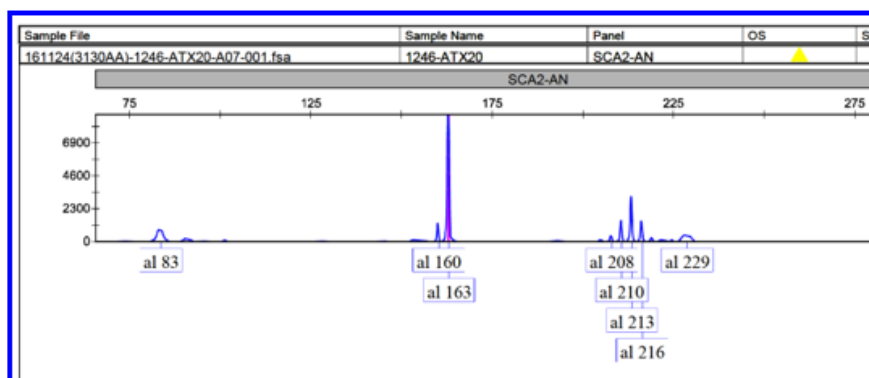


Figura 8: Resultado del estudio de microsatélites en el gen *ATXN2* en el paciente: se observa la presencia de dos alelos en heterocigosis, uno de 22 (163-96/3) y otro de 39 (213-96/3) repeticiones CAG. Intervalos de referencia: 14-31rep (normal), 32-34 (inestable) y 35-500 (patológico).

Posteriormente, se realizó el análisis mediante TP-PCR. No se observó expansión en los genes *ATXN1*, *ATXN3*, *CACNA1A* y *ATXN7*. Se obtuvo el siguiente resultado (Figura 9) en la TP-PCR del gen *ATXN2* realizada con el ADN del paciente:

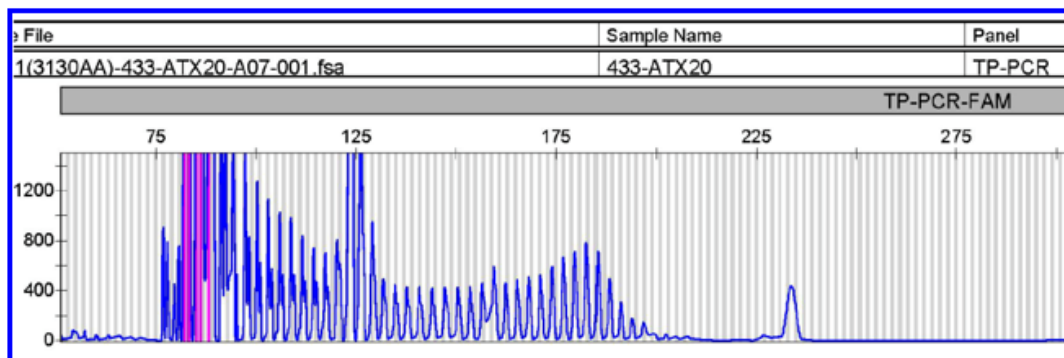


Figura 9: Resultado de la TP-PCR-reverse de la región del gen *ATXN2* donde se encuentran las repeticiones CAG.

El paciente es heterocigoto para un alelo normal de 22 repeticiones y uno patológico de 39 repeticiones CAG en el gen *ATXN2*. Este resultado es compatible con la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2).