

Análisis molecular de la ataxia de Friedreich en Colombia

Juan Carlos Prieto, Olga Lucía Pedraza, Mariluz Gómez, Clemencia Durán

RESUMEN

Introducción: la ataxia de Friedreich (FRDA), enfermedad autosómica recesiva, está asociada a una expansión de trinucleótidos GAA en el primer intrón del gen X25. La severidad de la enfermedad se asocia al número de repeticiones.

Objetivos: evaluar si existe correlación clínica y molecular en nuestros pacientes con FRDA.

Material y métodos: se estudiaron 24 pacientes con FRDA y 50 sujetos normales. Evaluamos la severidad de la enfermedad utilizando la escala internacional cooperativa de ataxia (EICA). Se tomaron muestras de sangre en pacientes y controles y mediante técnica de PCR se determinó el número de repeticiones GAA del gen FRDA.

Resultados: documentamos consanguinidad en cinco familias y herencia autosómica recesiva en siete. En 17 pacientes se observó la forma típica de FRDA y en siete la variante con reflejos conservados (FARR). La edad de inicio osciló entre los tres y 22 años. Las repeticiones GAA en la población colombiana presentaron un rango de 1-26. Un paciente heterocigoto para la expansión se consideró portador de una mutación en el otro alelo. Veinte pacientes fueron homocigotos para la expansión GAA, con repeticiones en un rango de 206 a 951. El promedio en el menor y el mayor alelo fue 650 y 709 repeticiones GAA respectivamente. La expansión es inestable durante la transmisión, observándose variabilidad en el número de repeticiones GAA en los descendientes.

Encontramos una relación inversa entre el tamaño de las expansiones y la edad de inicio de la enfermedad ($p < 0.05$) y una relación directa entre la expansión y la severidad de la enfermedad ($p < 0.01$). El estudio del polimorfismo FAD1 en los pacientes indicó una fuerte asociación del alelo B con el cromosoma de FRDA.

Conclusiones: el espectro de la expansión en FRDA es amplio en la población colombiana. Puede existir un efecto fundador de la mutación asociándose al alelo FAD1_B o bien las mutaciones de FRDA se originan en un alelo de riesgo.

El diagnóstico molecular a través de la determinación de la expansión GAA es una herramienta esencial en la práctica clínica y en la consejería genética en pacientes con ataxia recesiva o esporádica (Acta Neurol Colomb 2004; 20: 7-12).

Palabras clave. Ataxia de Friedreich, trinucleótidos GAA, genética poblacional, alelos de riesgo, herencia autosómica recesiva.

SUMMARY

Introduction: Friedreich's Ataxia (FRDA), an autosomal recessive disorder, is associated with the expansion of a GAA trinucleotide repeat in the first intron of the X25 gene.

Objectives: to determine if there is a correlation between clinical and molecular findings in our FRDA patients.

Material and methods: we studied 24 patients with FRDA and 50 controls. The severity of ataxia was evaluated with the international cooperative ataxia rating scale (ICARS). Molecular analysis by PCR, to identify GAA repeats, was done in a blood sample in patients and controls.

Results: consanguinity was documented in five families and autosomal recessive inheritance in seven. 17 patients have typical FRDA and seven FARR form. The patients showed a range in the age of onset from 3-22 years. The GAA repeats range in the normal Colombian individuals

Recibido: 15/01/2004. Revisado: 15/02/2004. Aceptado: 01/03/2004.

Dr. Juan Carlos Prieto: Instituto de Genética Humana, Hospital La Victoria Red Distrital de Genética; Dra. Olga Lucía Pedraza: Departamento Neurociencias, Hospital Universitario de San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana; Dras. Mariluz Gómez y Clemencia Durán: Instituto de Genética Humana, Bogotá, Colombia Correspondencia a Dra. Olga Lucía Pedraza Cra. 7 No. 40-62 (6 piso-Neurología) Bogotá, Colombia. E-mail: opedraza@javeriana.edu.co

was 1-26. Expand GAA repeats were found on both alleles of the frataxin gene in 20 patients. One patient was heterozygous for the expansion mutation and was known or expected carrier of a point mutation on the other allele. In the 20 patients who were homozygous for the GAA expansion, the repeats numbers ranged from 206 to 951. The mean numbers of GAA repeats on the smaller and the larger alleles were 650 and 709 respectively. The expansion was unstable during transmission, accounting for the variable number of GAA repeats among siblings. An inverse relation was found between the size of GAA expansion and age at onset ($p < 0.05$) and direct relation between smaller GAA expansion and several of disease ($p < 0.01$). The study of the single nucleotide polymorphism FAD1 in patients, indicate a strong association of the rare allele B to the FRDA chromosomes.

Conclusions: we demonstrated that the spectrum of FRDA is broader in the colombian population. A single founder effect mutation associated with FAD1B or the alternative hypothesis is that the different FRDA mutations have originated in an at risk allele. Direct molecular diagnosis through determination of the size of the GAA expansion should become an essential tool in clinical practice and genetic counseling for patients with recessive or sporadic cerebellar ataxias (*Acta Neurol Colomb* 2004; 20: 7-12)

Key words: Friederich's ataxia, GAA repeats, risk allele, colombian population genetic.

INTRODUCCIÓN

La ataxia de Friedreich (FRDA) es la forma más común de ataxia hereditaria. En Colombia constituye un 24% del total de las ataxias degenerativas (1).

Es una enfermedad autosómica recesiva, ocasionada por una mutación en el gen de FRDA, que codifica para la proteína llamada frataxina (2, 3). Los estudios sugieren que esta proteína está involucrada en el tráfico y disponibilidad del hierro mitocondrial (4, 5).

Más del 95% de los alelos de FRDA tienen una expansión en el número de repeticiones del trinucleótido GAA, en el primer intrón del gen de FRDA. Un pequeño porcentaje de pacientes son heterocigotos para la expansión y portan simultáneamente una mutación puntual en el otro alelo (6, 7).

Los primeros criterios diagnósticos fueron propuestos por Geoffrey en 1976 (8), luego Harding en 1981 (9) hizo una propuesta modificada de estos criterios. Algunos estudios han correlacionado el tamaño de la expansión de las tripletas GAA con la severidad de la enfermedad

y sus complicaciones y han sugerido una relación inversa entre el número de expansiones y la edad de inicio (5, 10-12).

A la luz de la heterogeneidad clínica y la posibilidad del diagnóstico a través de la evidencia de la expansión de las tripletas GAA en el cromosoma 9, decidimos estudiar un grupo de pacientes jóvenes con ataxia que cumplieran estrictamente o no los criterios de FRDA y analizar las repeticiones en la población normal colombiana. También investigamos el polimorfismo FAD1 en los pacientes que presentaron la expansión GAA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron pacientes con ataxia que fueron remitidos a la Unidad de neurología del Hospital Universitario de San Ignacio, entre enero de 1997 y diciembre de 2000, siguiendo los criterios diagnósticos de Harding (9). Luego de firmar el consentimiento informado, se colectaron muestras de sangre de 24 pacientes con diagnósticos de FRDA o ataxia de inicio en la adolescencia que provenían de 19 familias y de 50 sujetos normales (sin ataxia escogidos entre profesores y estudiantes de la Universidad Javeriana). La severidad de la enfermedad se determinó por medio de la Escala Internacional Cooperativa de Ataxia (EICA) luego de evaluar su confiabilidad (13).

El DNA se aisló de sangre periférica anticoagulada con EDTA con el método fenol-cloroformo y proteinasa K (14). La amplificación de la expansión GAA para FRDA se realizó mediante PCR XL (Kit Expand Long PCR (Boehringer Mannheim) con los amplímeros GAA-F y GAA-R (2). La amplificación fue realizada en las siguientes condiciones: una denaturalización a 96°C por tres minutos y 10 ciclos compuestos de los siguientes pasos: 94°C por 30 segundos, 68°C por 150 segundos, seguidos de 20 ciclos en los que la duración del paso de los 68°C se aumentó por 20 segundos/ciclo. Los productos del PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% y visualizados mediante coloración con bromuro de etidio. El tamaño de los alelos se determinó por comparación con un marcador Ladder DNA de 1Kb. Fueron calculadas las frecuencias alélicas y la heterocigocidad para los alelos de los locus de FRDA y de la población control.

El polimorfismo para el segmento FAD1 fue amplificado mediante PCR utilizando los amplímeros FAD1 S1 y FAD1 S2 (14) aplicando la técnica SSCP para su determinación. Los productos fueron separados en gel de poliacrilamida denaturante y los geles fueron teñidos de plata.

Aplicamos el test t con un valor de significancia $p < 0,05$ para la comparación de las medias del tamaño de las

expansiones GAA del alelo menor, la edad de inicio y la severidad de la enfermedad de los pacientes con forma clásica de FRDA y la variante FARR. Para determinar si existía una correlación entre las expansiones de tripletas GAA con la edad de inicio y la severidad de la enfermedad, se aplicó el test de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Los 24 pacientes provenían de 19 grupos familiares. En cinco familias existía consanguinidad entre los padres. De los 24 pacientes, 17 tenían un FRDA clásico y siete tenían la variante FARR. Veinte casos tenían expansión de la repetición de tripletas GAA en ambos alelos, en un caso confirmamos la expansión GAA en un solo alelo e inferimos la presencia de una mutación puntual en el segundo alelo y en tres casos no estaba presente la expansión GAA (Tabla 1).

La heterocigocidad estimada en el *locus* FRDA correspondió a 0.89, con un rango de tripletas GAA entre 1 y 26 en la población normal colombiana y de 206 a 951 en los sujetos afectados (Figura 1). El promedio de los alelos L (largos) y C (cortos) fue 790 y 650 respectivamente. De los 20 casos con expansión, 17 fueron FRDA clásicos y siete fueron variante FARR; el promedio de las repeticiones GAA en los pacientes con FARR fue 471.8 y 709.3 en FRDA clásica. La diferencia en el promedio de la edad de inicio, la severidad y el número de expansiones de tripletas fue estadísticamente significativa entre los dos tipo de FRDA ($p < 0.05$, $p < 0.001$ y $p < 0.05$ respectivamente) (Figuras 2-4)

Se encontró una correlación directa estadísticamente significativa entre la severidad de la ataxia evaluada por EICA y la expansión de las tripletas GAA del alelo corto ($p < 0.01$), mientras que la correlación entre la edad de inicio de la enfermedad y las expansiones de tripletas

Tabla 1. Frecuencia (%) de hallazgos clínicos.

Parámetros	Grupo		
	1 n=21	2 n=3	3 n=24
Marcha atáxica	100	100	100
Dismetría	100	100	100
Sillas de ruedas	33	33	33
Hipotonía	61	0	54
Ausencia de reflejos	63	66	71
Babinski	60	100	62
Disartria	80	100	83
Nistagmo	61	0	54
Oftalmopharesia	10	33	12
Pie cavo	42	33	41
Escoliosis	52	33	50
Anormal ECG/EKG	43	0	37
Neuropatía axonal	60	100	62
Anormalía Neuroconducciones	81	33	75

Grupo 1: pacientes con expansión GAA.
 Grupo 2: pacientes sin expansión GAA.
 Grupo 3: todos los pacientes con FRDA (con y sin GAA).

GAA del alelo corto mostró una relación inversa ($p < 0.05$) (Figuras 5 y 6).

El análisis de la diferencia de los promedios de los alelos paternos y maternos en 12 casos no mostró diferencia significativa (751.43+/- 74.84 y 721.89+/- 97.05 respectivamente), así como la diferencia entre el número de repeticiones GAA de padres y pacientes (734.81+/- 86.56 y 708.75+/- 190.26). Respecto a la dinámica intergeneracional de la expansión GAA, observamos dos casos con expansión y cuatro con contracción sin permitirnos identificar la vía de transmisión.

La frecuencia del alelo A del SNP FAD1 fue 0.858 en la población normal y 0.300 en individuos afectados, la

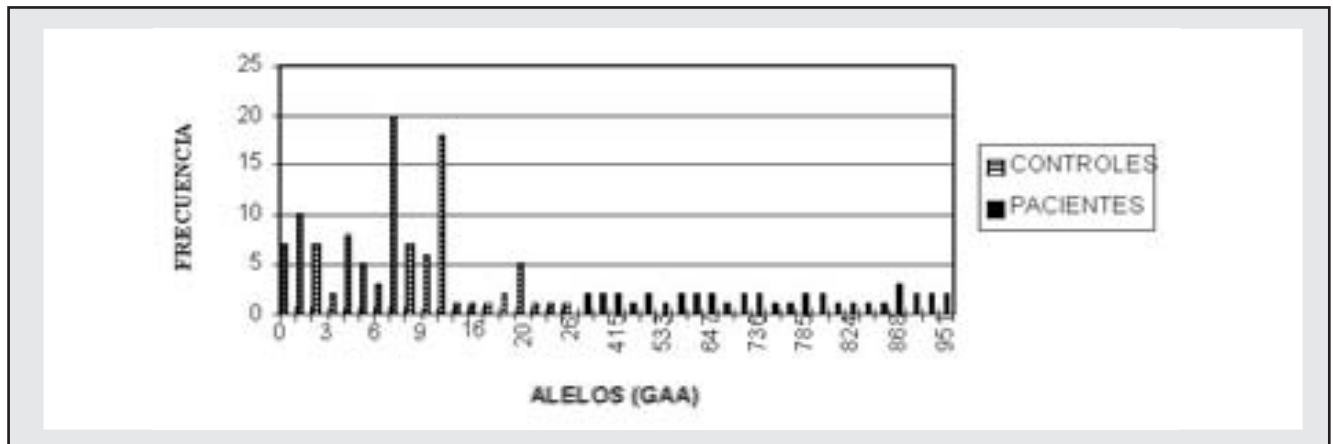


Figura 1. Repeticiones GAA en población normal colombiana y en pacientes con FRDA.



Figura 2. Edades de inicio de la enfermedad en FRDA y FARR.

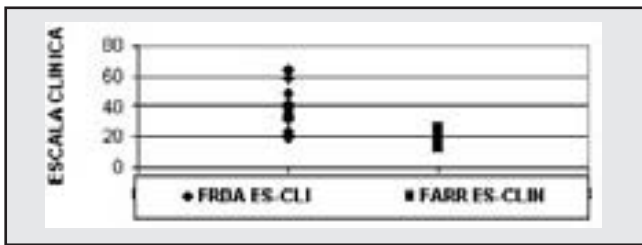


Figura 3. Severidad de la enfermedad en FRDA y FAAR.

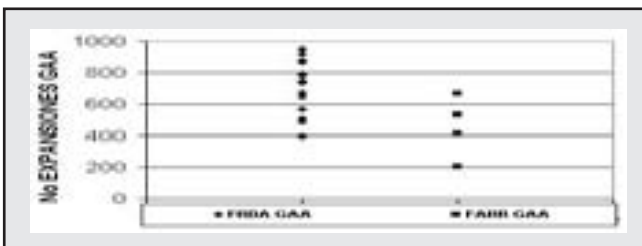


Figura 4. Número de expansiones en FRDA y FARR.

frecuencia del alelo B fue 0.142 en los controles y 0.700 en los pacientes; las dos poblaciones mostraron estar en equilibrio Hardy-Weinberg (X^2 controles = 0.002 $p < 0,1$ y X^2 pacientes = 0.402 $p < 0,8$). La frecuencia alélica FAD1 en cromosomas de sujetos normales y en FRDA indica una fuerte asociación con el alelo común A para los cromosomas normales y para el poco frecuente alelo B con el cromosoma FRDA de la población colombiana (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La determinación del número de repeticiones GAA permite confirmar el diagnóstico de FRDA. Un 87,5% de los casos fueron homocigotos para la expansión de tripletas GAA, a diferencia de otros estudios que muestran 95% y 100% de pacientes FRDA homocigotos para la expansión. Encontramos en nuestros pacientes una correlación negativa entre el número de tripletas del alelo corto y la edad de inicio de la enfermedad y una

Tabla 2. Alelo de riesgo FAD.

	Paciente	Control
Alelo A	11	52
Sin alelo A	9	1
Odds ratio=0.02 (0.00<OR<0.22) RR=0.19 $X^2=19.33$ $p < 0.0000146$.		
Alelo B	19	14
Sin alelo B	1	39
Odds ratio=52.93 (6.34<OR<1161.66) RR= 23.03 $X^2=24.88$ $p < 0.000006$.		

correlación positiva con la severidad de la enfermedad que estaría de acuerdo con lo descrito en estudios previos (7).

Demostramos una diferencia significativa entre en número de tripletas GAAs, edad de inicio y severidad entre los individuos con FRDA clásico y FARR, sugiriendo que las expansiones no inhiben totalmente la transcripción o la maduración de el mRNA frataxina, permitiendo una expresión residual de la proteína (6, 15, 16).

La hipotonía no ha sido descrita en los criterios clínicos propuestos (9), encontrándose en un 54% de nuestros pacientes. La heterogeneidad genética se evidenció en un 3.6% de los casos con hallazgos clínicos de FRDA pero no presentaban expansión de las tripletas GAA. Por las características fenotípicas debe evaluarse el nivel de vitamina E de estos pacientes, ya que el déficit de esta vitamina comparte las características clínicas de FRDA (17); otra posibilidad sería que estos pacientes presentaran mutaciones puntuales en sus dos alelos y por lo tanto se haría necesario caracterizarlas mediante secuenciación directa del gen FRDA.

Nuestros datos sobre el marcador FAD1, de acuerdo con lo reportado en España, proporcionaría una evidencia, en la que el alelo B FAD1 estaría asociado a la mutación GAA o podría ser un alelo de predisposición a la expansión, como un alelo de riesgo, mientras que el alelo A FAD1 se comportaría como un alelo de protección (14).

Si entendemos el comportamiento clínico y molecular de nuestros pacientes con ataxias degenerativas, conociendo las características genéticas poblacionales normales, y consideramos otras alteraciones bioquímicas ya descritas en estas patologías (18) lograremos sin duda avanzar hacia una aproximación terapéutica más racional con los resultados de los ensayos clínicos existentes y de los que se encuentran en curso (19-21).

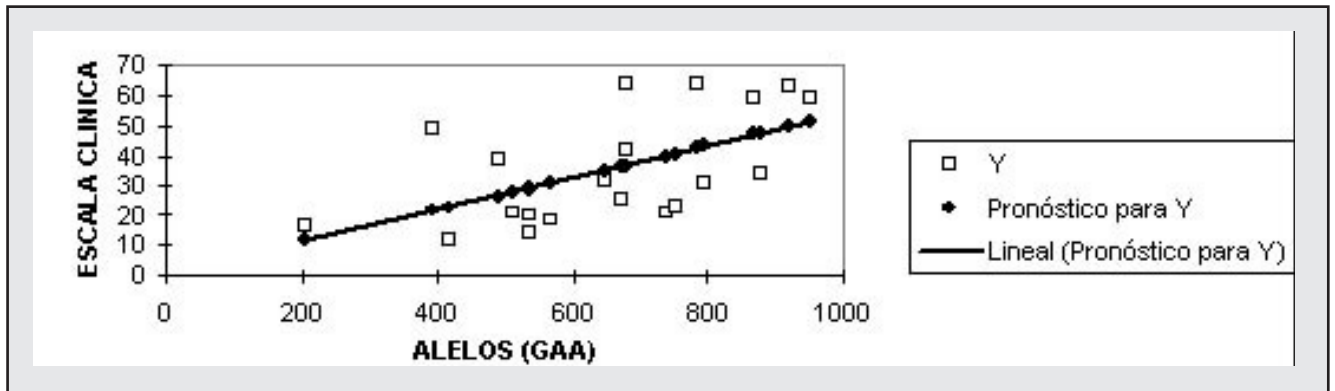


Figura 5. Correlación entre la severidad y el número de repeticiones GAA en el alelo corto ($n=20$, $r= 2.95$ $p < 0.01$).

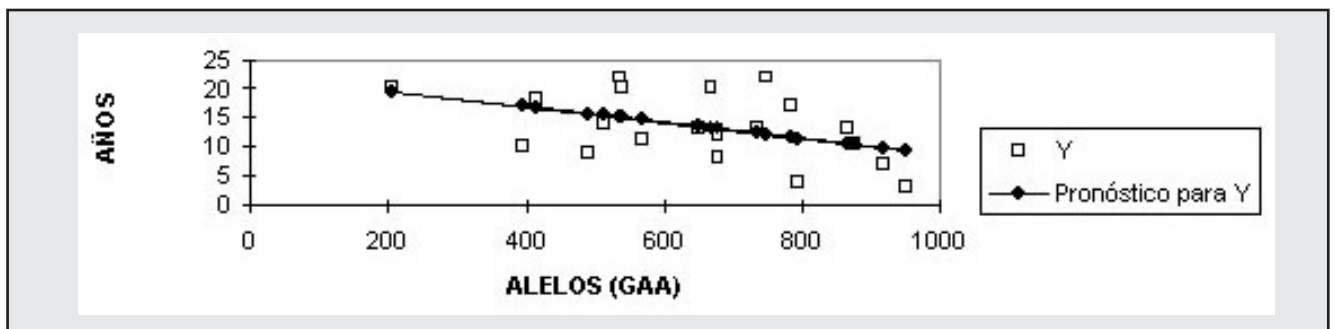


Figura 6. Correlación entre la edad de inicio y el número de repeticiones GAA en el alelo corto en los 20 pacientes ($n=20$, $r=$

CONCLUSIÓN

El espectro de la expansión en FRDA es amplio en la población colombiana. Puede existir un efecto fundador de la mutación asociándose al alelo FAD1_B o bien las mutaciones de FRDA se originan en un alelo de riesgo.

En nuestro país, muchos casos de ataxia degenerativa se presentan de forma esporádica y ocurren en familias no consanguíneas, donde la herencia autosómica recesiva no puede demostrarse; el diagnóstico molecular a través de la determinación de la expansión GAA se constituye como una herramienta esencial en la práctica clínica y en la consejería genética en pacientes con ataxia recesiva o esporádica.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó con el apoyo financiero de Colciencias y la Pontificia Universidad Javeriana. Agradecemos a los pacientes y sus familias, a la Asociación Colombiana de Ataxia Hereditaria (ACAT), a la Unidad de Neurología del Departamento de Neurociencias del Hospital San Ignacio y al Instituto de Genética Humana.

En especial queremos agradecer a los colegas médicos generales, neurólogos y terapeutas de las siguientes instituciones que remitieron sus pacientes: Hospital San José, Hospital Militar Central, Hospital de Kennedy, Hospital San Juan de Dios, Instituto Franklin D. Roosevelt, Instituto de Seguros

Sociales, Hospital San Rafael (Bogotá y Tunja), Comfenalco, Cajanal, CARE (Barranquilla.), FIRE (Cartagena), Fundación Valle de Lilly (Cali), Colsánitas, San Vicente de Paúl (Medellín), Pablo Tobón Uribe (Medellín), Fundación Santa Fe, Clínica de Marly, Hospital Santa Clara, Hospital de La Samaritana, Policlínico del Olaya, EPS Famisanar y Cafesalud.

REFERENCIAS

1. **Pedraza OL, Prieto JC, Durán C, Gómez ML.** Clinical and genetic analysis in 100 Colombian spinocerebellar ataxic patients (sometido a publicación)
2. **Campuzano V, Montermini L, Mólto M et al.** Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; **271**:1423-1427.
3. **Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, Dollé P, Cazzalini O, Koenig M.** Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 1997; **16**:345-351.
4. **Babcock M, De Silva D, Oaks R et al.** Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh 1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 1997; **276**:1709-1711.
5. **Delatycki M, Paris D, Gardner M et al.** Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population. *Am J Med Genet* 1999; **87**:168-174.
6. **Bidichandani S, Ashizawa T, Patel P.** Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a Novel Missense Mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am J Hum Genet* 1997; **60**:1251-1256.
7. **Cossée M, Schmit M, Campuzano V et al.** Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and permutations. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 1997; **94**:7452-7457.
8. **Geoffrey F, Barbeau A, Breton G et al.** Clinical description and roentgenologic evaluation of patients with Friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci* 1976; **3**: 279-286.
 9. **Harding AE.** Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol* 1993; **61**:1-14.
 10. **Dürr A, Cossée M, Agid Y et al.** Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 1996; **335**:1169-1175.
 11. **Filla A, De Michele G, Cavalcanti F et al.** The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 1996; **59**:554-560.
 12. **Lamont P, Davis M, Wood N.** Identification and sizing of the GAA trinucleotide repeat expansion of Friedreich's ataxia in 56 patients. Clinical and genetic correlates. *Brain* 1997; **120**:673-680.
 13. **Pedraza OL, Morillo LE, Hernández D et al.** Intra and interrater reliability of the International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS). *JNS* 2001; **187 S1**: S515.
 14. **Monrós E, Cañizares J, Moltó M et al.** Evidence for a common origin of most Friedreich ataxia chromosome in the spanish population. *Eur J Hum Genet* 1996; **4**:191-198.
 15. **Bidichandani S, Ashizawa T, Patel P.** The GAA triplet. Repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* 1998; **62**:111-121.
 16. **Oshima K, Montermini L, Wells R, Pandolfo M.** Inhibitory effects of expanded GAA*TTC triplet repeats from intron of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J Biol Chem* 1998; **273**:14588-14595.
 17. **Hamman S, Kennedy C.** Ataxia with isolated vitamin E deficiency presenting as mutation negative Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Pschy* 1998; **64**:368-370.
 18. **Pedraza OL, Botez MI.** Status of thiamine in inherited ataxias. *J Neurol Neurosurg and Psychiatry* 1992; **55**:136-137
 19. **Botez MI, Botez T, Elie R, Pedraza OL, Goyette, Lalonde R.** Amantadine hydrochloride in hereditary degenerative ataxias: A double blind study. *J Neurol, Neurosurg and Psychiatry* 1996; **61**:259-264
 20. **Buyse G, Mertens L, Di Salvo G et al.** Idebenone treatment in Friedreich's ataxia: neurological, cardiac, and biochemical monitoring. *Neurology* 2003; **60**: 1679-81
 21. **Mariotti C, Soliari A, Torta D, Marano L, Fiorentini C, Di Donato S.** Idebenone treatment in Friedreich patients: one year-long randomized placebo-controlled trial.