

Diagnóstico molecular de ataxias espinocerebelosas: reporte del primer caso de ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3) en Costa Rica confirmado por análisis molecular

Molecular diagnosis of spinocerebellar ataxias: report of the first case of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) in Costa Rica confirmed by molecular analysis

Resumen

Antecedentes. Las ataxias hereditarias son un grupo de trastornos genéticos caracterizados por descoordinación progresiva de la marcha, a menudo asociada con una pobre coordinación de las manos, el habla y los movimientos oculares. Dentro de las ataxias hereditarias, están las ataxias espinocerebelosas (SCAs), que comprenden un grupo de trastornos muy heterogéneo desde el punto de vista clínico, patológico y genético.

Metodología. Un total de 20 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de una SCA, fueron referidos al INISA con el propósito de realizar estudios genéticos. Las ataxias tamizadas fueron las de herencia autosómica dominante más frecuentes: SCA1, SCA2, SCA3 y SCA6. El análisis molecular se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en geles desnaturizantes de urea-acrilamida con la posterior tinción con nitrato de plata, y en algunos casos hibridación southern blot (radioactivo) de los productos de PCR.

Resultados. Solamente en uno de los pacientes, con claros antecedentes familiares, la prueba genética para la SCA3 dio positiva. En los demás pacientes no se pudo confirmar a nivel molecular el diagnóstico clínico.

Conclusiones. Este estudio representa un esfuerzo para establecer en Costa Rica el diagnóstico molecular de algunas ataxias hereditarias. El determinar la mutación causante de la ataxia tipo 3, nos permitió dar al paciente una clasificación clínica correcta y brindarle el respectivo asesoramiento genético. Se evidencia una considerable heterogeneidad etiológica entre las enfermedades degenerativas con trastornos de la marcha, indicando la necesidad de reevaluar clínicamente y de hacer estudios adicionales en los demás pacientes.

Financiamiento: Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Palabras clave: Ataxias espinocerebelosas (SCAs). Ataxias hereditarias. Costa Rica. Diagnóstico molecular. Repeticiones CAG.

M.Sc Melissa Vásquez Cerdas¹,
Dr. Húberth Fernández Morales²,
Ph.D Patricia Cuenca Berger³, Ph.D
Fernando Morales Montero⁴

¹ Bióloga. M.Sc en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular. Sección Genética-Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

² Médico Cirujano, Especialista en Neurología. Servicio de Neurología, Hospital La Católica, San José, Costa Rica.

³ Bióloga. Ph.D en Ciencias Naturales, profesora catedrática. Sección Genética-Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) y Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

⁴ Biólogo. Ph.D en Filosofía, profesor catedrático. Sección Genética-Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) y Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Correspondencia: Melissa Vásquez Cerdas, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica. Código postal: 2060 San José. Tel: (506)2511-2150. Fax: (506) 2511-5130. Correo electrónico: melissa.vasquez@ucr.ac.cr

Abstract

Background. *The hereditary ataxias are genetic disorders characterized by slowly progressive incoordination of gait and often associated with poor coordination of hands, speech, and eye movements. There are a group of hereditary ataxias, the spinocerebellar ataxias (SCAs), which comprise a highly heterogeneous group from the clinical, pathological and genetic point of view.*

Methodology. *A total of 20 patients with clinical diagnosis or suspect of SCA were referred to INISA for the purpose of performing genetic studies. The ataxias studied were the autosomal dominant ataxias most frequent: SCA1, SCA2, SCA3 and SCA6. Molecular analysis was carried out by polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis on urea-acrylamide denaturing gels with subsequent silver nitrate staining, and in some cases southern blot (radioactive) hybridization of PCR products.*

Results. *Only in one patient, with a clear family history, the genetic test for SCA3 was positive. In the other patients, the clinical diagnosis could not be confirmed at the molecular level.*

Conclusions. *This study represents an effort to establish in Costa Rica the molecular diagnosis of some hereditary ataxias. Determining the causative mutation of type 3 ataxia allowed us to give the patient a correct clinical classification and provide the respective genetic counseling. There is a considerable etiological heterogeneity between degenerative diseases with gait disorders, indicating the need to reevaluate clinically and to perform additional studies in the other patients.*

Funding: *Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica.*

Keywords: Spinocerebellar ataxia (SCA). Hereditary ataxias. Costa Rica. Molecular diagnosis. CAG repeats

Introducción

Las ataxias hereditarias son un grupo de trastornos genéticos caracterizados por descoordinación progresiva de la marcha; a menudo asociada con una pobre coordinación de las manos, el habla (disartria), los movimientos oculares y con frecuencia se presenta atrofia del cerebelo. Las ataxias hereditarias pueden ser divididas de acuerdo al modo de herencia. Dentro de las ataxias hereditarias autosómicas dominantes están las ataxias espinocerebelosas (SCAs), las cuales comprenden un grupo de trastornos neurodegenerativos muy heterogéneo desde el punto de vista clínico, patológico y genético⁽¹⁻⁴⁾.

La prevalencia mundial de las ataxias hereditarias autosómicas dominantes se estima en aproximadamente 1-5 casos por cada 100.000 habitantes⁽⁵⁻⁶⁾. De las SCAs, la ataxia tipo 3 (SCA3) es la más común a nivel mundial. Las SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, y SCA7 explican más del 60 % de las ataxias autosómicas dominantes. Todas estas SCAs son causadas por repeticiones de tripletas CAG inestables en los genes respectivos⁽⁷⁾.

Su baja prevalencia hace que este tipo de enfermedades se engloben dentro del grupo conocido como enfermedades raras y por lo tanto, en la actualidad, existe mucho desconocimiento social de las mismas. La aparición típica de los síntomas en las SCAs ocurre generalmente entre la tercera y cuarta década de vida, pero hay muchas variaciones entre los subtipos y los síntomas, pues hay reportes de inicio en la infancia e incluso después de los 60 años (8). Según nuestro conocimiento, a la fecha no existe información en relación con las ataxias espinocerebelosas (SCAs) en Costa Rica.

Materiales y Métodos

Población de estudio

Para esta investigación, la población de estudio consistió de un total de 20 pacientes que presentaban un diagnóstico clínico presuntivo de una ataxia espinocerebelosa (SCA), con o sin historial familiar, y con ataxia como signo clínico característico. Los pacientes fueron referidos al Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, por un neurólogo entre

el 2010 y el 2014 con el propósito de realizar estudios genéticos por ataxias. La ataxia como signo clínico hace referencia a la pérdida de control de los movimientos voluntarios del cuerpo y a la incapacidad para coordinar la marcha y la postura.

Diagnóstico Molecular

Una vez firmada la fórmula de consentimiento informado (debidamente aprobada por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica), a cada paciente se le tomó una muestra de sangre periférica de donde se obtuvo el ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de leucocitos mediante extracción con fenol-cloroformo según los procedimientos usuales ⁽⁹⁾. La muestra de ADN de los pacientes se usó para realizar el diagnóstico molecular de algunas ataxias dominantes en el INISA.

El análisis molecular de las mutaciones, para determinar el tipo de SCA presente en cada paciente, se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en geles desnaturizantes de urea-acrilamida con la posterior tinción con nitrato de plata. Para esto, se usaron las secuencias de los iniciadores y las condiciones experimentales previamente publicadas, con algunas modificaciones ⁽¹⁰⁻¹³⁾.

En los casos donde solo se detectó un único tamaño del producto de PCR, éste fue sometido a hibridación de Southern blot. Para esto, los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con la sonda DM56 la cual se marcó

con -P32 (14-15). En algunos casos, los productos de la PCR fueron extraídos de un gel de agarosa al 2% y purificados utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Posteriormente los productos purificados se secuenciaron usando el Kit Big Dye V3.1 (AppliedBiosystems) en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (AppliedBiosystems). Las secuencias fueron analizadas con el programa 4Peaks (mekentosj.com) con el fin de determinar el número exacto de repeticiones CAG. Inicialmente se realizó el estudio genético para la(s) SCA(s) con la(s) que venía referido cada paciente (diagnóstico clínico presuntivo). Si el resultado fue negativo, se procedió a analizar la(s) muestra(s) para las otras SCAs. Las SCAs analizadas en esta investigación fueron SCA1, SCA2, SCA3 y SCA6. Es importante mencionar que en este estudio se usaron muestras de pacientes positivos y negativos y con tamaño de la expansión conocido para las SCAs analizadas. Estas muestras (controles) fueron donadas por la Dra. Laura Ranum de la Universidad de Florida, USA.

Resultados

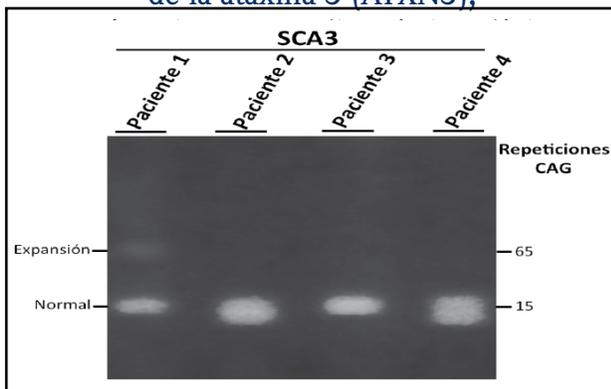
De los 20 pacientes analizados, únicamente cuatro de ellos presentaban claros antecedentes familiares acordes con un patrón de herencia autosómico dominante. Seis pacientes pertenecían a familias con más de un miembro afectado en una misma generación y los restantes 10 correspondían a casos de ataxias aislados, aparentemente esporádicos, en cada una de sus familias (Cuadro 1). Sin embargo, solamente uno de los pacientes estudiados resultó

	Casos herencia dominante	Casos herencia incierta /recesiva?	Casos esporádicos	Total y/o Promedio
N	4	6	10	20
Sexo (□/□)	2/2	6/0	4/6	12/8
Transmisión (M/P)	2/2	-----	-----	2/2
Edad toma muestra (años)	31.25 ± 21.2	37.3 ± 13.5	45.2 ± 16.3	40.0
Edad de inicio (años)	25.3 ± 20.4	23.8 ± 17.3	40.1 ± 18.2	32.7 ± 19
Inicio temprano*/tardío	2/2	4/2	2/8	8/12
SCA3 (%)	1 (25%)	0	0	1(5%)
Otras SCAs	0	0	0	0

M: materna; P: paterna; *Inicio temprano definido como ≤25 años; SCA: ataxia espinocerebelosa

positivo para una de las mutaciones de los genes en estudio; en este caso la prueba genética resultó positiva para la ataxia tipo 3 (SCA3) (Figura 1). Mediante secuenciación directa se confirmó que el paciente presenta 65 repeticiones de la tripleta CAG en el gen de la ataxina 3 (ATXN3). La familia de este probando tenía claros antecedentes familiares de ataxia tipo 3 (SCA3) o enfermedad de Joseph Machado (MJD), donde tanto el padre (ya fallecido) como una hermana se encontraban afectados. No nos fue posible realizar la prueba genética para la SCA3 para estos dos individuos debido a que no contamos con las muestras de ADN.

Figura 1. Gel de agarosa al 2%, teñido con gel red, donde se observan productos de PCR para el gen de la ataxina 3 (ATXN3),



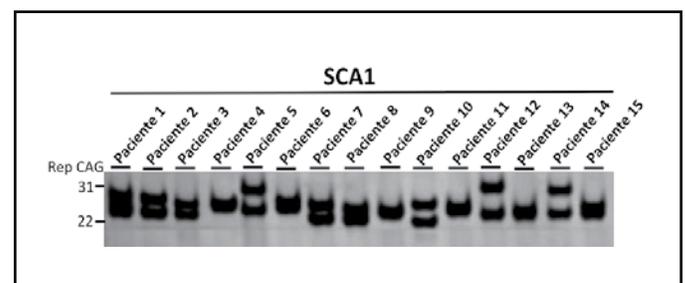
En el paciente 1 se observa una expansión de 65 repeticiones de la tripleta CAG, lo que indica que este paciente está afectado con la ataxia tipo 3 (SCA3). En los pacientes 2, 3 y 4 se observan alelos con repeticiones de tamaños normales (<44 CAG), o sea no están afectados con la SCA3.

El probando positivo para la SCA3 es un paciente masculino de 38 años. No padece de trastornos tiroideos, hipertensión o diabetes, pero si hay antecedentes de diabetes mellitus en la familia paterna e hipertensión en la madre. Niega alergias. Tiene antecedente de fumado por 15 años (un paquete por día, suspendió fumado en 2013) y consumo ocasional de alcohol. En el 2007 se le coloca una derivación ventrículo peritoneal por quiste aracnoideo de fosa posterior, sin complicaciones. En setiembre de 2014 se le coloca una banda gástrica por obesidad, con lo

cual pierde 30 kilogramos de peso en los meses siguientes; desde entonces está en tratamiento con vitamina B12 en forma regular. El probando consulta los servicios de salud por una sensación de incoordinación, pero que no le limita la marcha. A la exploración se encuentra al paciente en buen estado general y con signos vitales estables. Su condición cardiopulmonar y el abdomen se encuentran en estado normal. La exploración neurológica solo evidencia ligera dificultad en la marcha punta-talón. No se documentan alteraciones en la fuerza muscular, fondo de ojo, pares craneales, sensibilidad y pruebas de dedo – nariz. El tono muscular es normal. Se revisa una resonancia magnética de cerebro que no evidencia cambios importantes en comparación con los estudios del 2007. En la primera valoración no queda claro si los problemas de incoordinación actuales puedan ser debidos al quiste subaracnoideo de fosa posterior, o si por el contrario el paciente podría estar sufriendo de síntomas iniciales de una ataxia espinocerebelosa. Por este motivo se solicitaron los estudios genéticos para confirmar el diagnóstico presuntivo de la SCA3.

Para el resto de los pacientes, las pruebas resultaron negativas para todas las SCAs tamizadas, como se observa por ejemplo para la SCA1 (Figura 2, Cuadro 1). Por lo tanto, en estos pacientes no se pudo confirmar a nivel molecular el diagnóstico clínico.

Figura 2. Gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata donde se observan productos de la PCR para el gen de la ataxina 1 (ATXN1) en 15 pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de una ataxia dominante.



En todos los casos se observan productos de PCR de tamaño normal (<39 CAG), por lo que ninguno de estos pacientes está afectado con la ataxia tipo 1 (SCA1). A la izquierda se indica el número de repeticiones CAG

Discusión y conclusiones

Este estudio representa un esfuerzo para establecer en Costa Rica el diagnóstico molecular de las ataxias espinocerebelosas (SCAs) autosómicas dominantes (causadas por mutaciones inestables) más frecuentes a nivel mundial, con lo cual se espera favorecer el manejo clínico de los pacientes y que pueda ser traducido en un incremento en su calidad de vida.

El análisis molecular nos permitió encontrar en uno de los pacientes, una expansión de tripletas CAG en el gen de la Ataxina 3 (ATXN3), lo que significa que el paciente tiene la ataxia tipo 3 (SCA3), la cual es el subtipo más frecuente a nivel mundial ⁽⁷⁾. Los alelos de individuos afectados con el fenotipo clásico de la SCA3 presentan entre 60 CAG y 87 CAG ⁽¹⁶⁾, en nuestro caso, el paciente presenta 65 repeticiones de la tripleta CAG. Una prueba genética positiva establece el diagnóstico, por lo tanto, se pudo dar al paciente una clasificación clínica correcta y brindarle el respectivo asesoramiento genético.

A los demás pacientes se les dio la recomendación de ser reevaluados clínicamente, pues no se encontró ninguna de las mutaciones estudiadas, es decir, resultaron negativos para mutaciones responsables de las ataxias 1, 2, 3 y 6. A estos pacientes se les hizo entrega de un reporte escrito mediante el cual se les informó que los resultados indican que la enfermedad que ellos tienen no corresponde con las que se tamizaron en este estudio y el significado de esto.

Teniendo en cuenta los resultados de poblaciones estudiadas previamente, se esperaría encontrar la causa genética en al menos el 50% de los casos con diagnóstico de una ataxia autosómica dominante ⁽⁴⁾. Sin embargo, en nuestro caso, sólo el 25 % de los pacientes con antecedentes familiares de herencia autosómica dominante (1 de 4 pacientes) resultó portar una de las mutaciones tamizadas (Cuadro 1). Queda por determinar la causa genética subyacente en los otros pacientes. Podría tratarse de ataxias dominantes conocidas que no fueron tamizadas, como la SCA10 o la atrofia dentato-rubro palidoluisiana (DRPLA). Asimismo posibles efectos fundadores u otras mutaciones desconocidas podrían explicar parcialmente estos porcentajes.

En el caso de los pacientes que pertenecían a familias con más de un miembro afectado en una misma generación, podría ser sugestivo de una SCA pero de herencia autosómica recesiva, sin embargo en este estudio no se tamizaron mutaciones para ataxias de herencia recesiva. La prevalencia de los tipos de ataxias hereditarias autosómicas recesivas se estima en aproximadamente 3 casos por 100000, con la ataxia de Friedreich, la ataxia-telangiectasia, y la apraxia oculomotora siendo las más comunes ⁽⁶⁾.

Por otra parte, una historia familiar negativa o desconocida no excluye una SCA: padres afectados pueden haber muerto antes de llegar a la edad de inicio de los síntomas (principalmente en SCAs con inicio tardío); parientes portadores de una mutación pueden aparecer clínicamente como no afectados debido a un fenotipo más leve (quizás menor número de repeticiones o debido a penetrancia reducida); la historia familiar podría ser negativa debido a falsa paternidad o podrían tratarse de casos de mutaciones de novo. A pesar de que según la literatura, la frecuencia de pruebas genéticas positivas en pacientes con aparente ataxia esporádica va de 2% a 22% ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾, en nuestro grupo de “casos esporádicos”, las pruebas genéticas resultaron negativas. Por supuesto, el rigor de los criterios de inclusión para tamizaje de SCAs autosómicas dominantes, en los casos esporádicos, podría influir en los resultados en este grupo de pacientes.

El hecho de que en la gran mayoría de los pacientes no se pudo confirmar a nivel molecular el diagnóstico clínico, y por lo tanto no se les pudo dar una clasificación clínica certera, evidencia una considerable heterogeneidad etiológica entre las enfermedades degenerativas con trastornos de la marcha, indicando la necesidad de estudios adicionales en estos pacientes. Las enfermedades neurológicas degenerativas con trastornos de la marcha como las SCAs, son heterogéneas y difíciles de clasificar, debido a que dentro de un subtipo genético, los signos clínicos son muy variables y hay un notable traslape fenotípico entre ellas ⁽¹⁹⁾. A menudo es difícil poder diferenciar entre varias ataxias de herencia autosómica dominante, ya que las manifestaciones más frecuentes de todas las ataxias autosómicas dominantes son ataxia progresiva de la marcha del adulto y disartria

asociada con atrofia cerebelosa, y las edades de inicio se traslapan.

Por otra parte, existen varias enfermedades genéticas que podrían confundirse, desde el punto de vista fenotípico, con las SCAs y que deben ser consideradas por los médicos en el diagnóstico diferencial de las SCAs de herencia dominante. Entre estas enfermedades se pueden citar: ataxias episódicas (EA 1-5), paraplejía espástica hereditaria (HSP), enfermedad de Huntington (HD), el tremor esencial y neuropatías sensoriales motoras hereditarias (HSMN); además de algunos trastornos autosómicos recesivos y enfermedades mitocondriales. En particular, las leucodistrofias, las citopatías mitocondriales como el síndrome de Kearns-Sayre, el síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (MERRF), el síndrome de encefalomiopatía mitocondrial, la acidosis láctica y episodios tipo stroke-like (MELAS), el síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentaria (NARP), el síndrome de Leigh y la ataxia de Friedreich (FRDA); además del síndrome X frágil (FRAXA), la epilepsia mioclónica progresiva o la atrofia multisistémica (MSA), deberían también ser considerados (20).

También es importante recalcar que el diagnóstico diferencial de las ataxias hereditarias debe incluir la consideración de causas adquiridas y no genéticas como: golpes en la cabeza, accidentes cerebrovasculares, un tumor cerebral, un cáncer en otra parte del cuerpo (ovario, pulmón), una hemorragia cerebral, enfermedades metabólicas, problemas endocrinos (hipotiroidismo), una infección viral severa (meningitis), malformaciones congénitas del cerebro o cerebelo, deficiencias de vitaminas (vitamina E, vitamina B12), exposiciones a ciertas drogas, medicamentos o toxinas (antiepilépticos, benzodiacepinas, metales pesados, alcohol, etc), un paro cardíaco o respiratorio, entre otras. La posibilidad de una causa no genética debe tenerse en cuenta en cada individuo con ataxia, esto debido a que pueden estar disponibles tratamientos específicos (7).

Es importante que los médicos soliciten las pruebas moleculares después de considerar todas las características clínicas y epidemiológicas, además de excluir otras enfermedades o posibles causas no genéticas (diagnóstico diferencial), con el fin de reducir el número de pruebas genéticas

y estrechar las posibilidades diagnósticas. Aunque por el momento no hay tratamientos específicos que puedan prevenir, retrasar o revertir las principales características clínicas de las SCAs dominantes, algunas manifestaciones como convulsiones pueden ser tratadas y determinadas medidas de rehabilitación pueden ser de beneficio para los pacientes afectados por este grupo de enfermedades.

Agradecimientos

A William Araya Hidalgo y Dayana Vargas Sanabria del INISA por su ayuda técnica. A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por la ayuda económica

Conflictos de interés

No hay conflictos de interés

Bibliografía

1. Basu P, Biswanath Ch, Gangopadhaya PK et al. Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. *Hum Genet* 2000; 106: 597-604.
2. Silveira I, Miranda C, Guimaraes L et al. Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)_n allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol* 2002; 59: 623-629.
3. Manto M. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *The Cerebellum* 2005; 4: 2-6.
4. Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet* 2010; 9: 885-894.
5. van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NV, Kremer HP. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*. 2002;58:702-8.
6. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*. 2014;42:174-83.
7. Bird TD. Hereditary Ataxia Overview. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (online resource). Copyright University of

- Washington, Seattle. 1998-2016. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/#ataxias>. REF.pulst.2010.1
8. Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004; 3: 291-304.
 9. Potter N, Spector E, Prior T. Technical Standards and Guidelines for Huntington Disease Testing. *Genet Med* 2004; 6:61-65.
 10. Orr HT, MY Chung and S Banfi et al. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 1993; 4:221-226.
 11. Pulst SM, A Nechiporuk and T Nechiporuk et al. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 1996; 14: 269-277.
 12. Kawaguchi Y, T. Okamoto, M.Taniwaki et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994; 8: 221-228.
 13. Zhuchenko O, J. Bailey, P. Bonnen et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997; 15: 62-69.
 14. Morales F, Cuenca P, Brian R, Sittenfeld A, Del Valle G. Diagnóstico molecular de la distrofia miotónica (DM) en Costa Rica. *Acta MedCostarric* 2001;43(4):159-167.
 15. Cuenca P, Morales F, Castro I. Diagnóstico directo de la mutación que causa el síndrome del cromosoma X frágil. Experiencia en Costa Rica. *Acta Med Costarric* 2002; 44(1): 27-33.
 16. Paulson H. Spinocerebellar Ataxia Type 3. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (online resource). Copyright University of Washington, Seattle. 1998-2015. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1196/>
 17. Schols L, Szymanski S, Peters S et al. Genetic background of apparently idiopathic sporadic cerebellar ataxia. *Hum Genet* 2000; 107: 132-137.
 18. Pujana MA, Corral J, Gratacos M et al. Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: Genetic analysis of familial and sporadic cases. The Ataxia Study Group. *Hum Genet* 1999; 104: 516-522.
 19. Manto M. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *The Cerebellum* 2005; 4: 2-6.
 20. Manto M. Chapter 23: Dominant Ataxias. In *Cerebellar disorders: A practical approach to Diagnosis and management*, ed. M. Manto. Cambridge, NY: Cambridge University Press, New York 2010, pp. 242-283