

**Universidad de Costa Rica
Sistema de Estudios de Posgrado**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD
DE HUNTINGTON EN COSTA RICA**

***Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Biología
para optar por el grado de Magister Scientiae en Biología
con énfasis en Genética y Biología Molecular***

Melissa Vásquez Cerdas

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2005

DEDICATORIA

**A Dios: que me dio las fuerzas y la capacidad
para realizar este trabajo**

A mis padres: Carlos Luis y Lizeth

A mis hermanos: Rebeca y Carlos Manuel

A mi novio: Max

¡¡Gracias a todos por su apoyo y amor incondicional!!

¡¡Gracias por estar siempre conmigo!!

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento de todo corazón a las siguientes personas:

A mis padres, por haberme dado una educación, por darme la fuerza para seguir adelante y por impulsarme a superarme y a ser mejor cada día. Los amo!!

A mis hermanos: por su apoyo, por su ayuda, pero principalmente gracias por su comprensión y por aguantarme cuando estaba estresada.

A mi novio, simplemente GRACIAS por ser como eres y por estar SIEMPRE a mi lado.

A toda mi familia: abuelos, tíos y primos, que siempre estuvieron pendientes del desarrollo de mi tesis y de mí.

A la Dra. Patricia Cuenca, tutora de mi tesis, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis con ella, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo, por sus valiosísimas enseñanzas, sugerencias y principalmente por ser antes de mi tutora una excelente amiga y un ejemplo a seguir. Te quiero muchísimo!!

Al Dr. Jaime Fornaguera, por todas sus enseñanzas, consejos y por la dedicación especial en la revisión y orientación de esta tesis, pero principalmente por su gran amistad, alegría y simpatía y por incentivar en mí el interés por las Neurociencias.

Al M.Sc. Fernando Morales, por su enorme disposición para ayudarme siempre, por sus consejos, por compartir conmigo todos sus conocimientos y experiencia. Por su ayuda en la localización de las familias, recolección de las muestras y estandarización de los protocolos de laboratorio. En fin, por estar siempre al pendiente del desarrollo de mi tesis.

A Fernando Ortiz, por su adiestramiento, sugerencias en el laboratorio y por su invaluable ayuda, disposición y tiempo en la recolección de las muestras, pero sobre todo gracias por ser ese gran amigo que eres y por compartir conmigo tantos buenos momentos.

A Andrey, que puedo decirte, simplemente gracias por ser tan especial, por alegrarme la vida con tu forma de ser, por tu entusiasmo, por tu apoyo. En definitiva, gracias por ser un VERDADERO AMIGO, el amigo que cualquier persona desearía tener. No cambies!!!

A mis amigos y compañeros del INISA: Zaida, Rebe, Auxi, Wendy, Adri, Saylen y Warner porque de una u otra manera siempre estuvieron pendientes de mí y de mi tesis, preocupándose por cómo salían los experimentos y aportándome ideas y sugerencias.

Gracias por su apoyo incondicional pero principalmente gracias su amistad, por ser tan especiales conmigo y por hacer del laboratorio un sitio de convivencia especial.

A mis amigos y compañeros de Biología: porque fueron una parte muy importante en mi camino hacia esta meta, por compartir conmigo tantos buenos momentos y por preguntar por el desarrollo de mi tesis siempre que nos veíamos. Los quiero mucho!!!

A los doctores Gerardo del Valle y Húbert Fernández, por su ayuda en la localización de los casos índices y por la evaluación clínica y seguimiento de los pacientes.

A los psicólogos Domingo Campos y Benicio Gutiérrez, por su enorme colaboración en todo lo relacionado con el componente de evaluación y asesoría psicológica a los pacientes del estudio y sus familiares.

Al personal técnico, administrativo y profesional del INISA, que de una u otra forma apoyaron la realización de este proyecto con su colaboración y facilidades brindadas.

A las familias que participaron en este estudio y que amablemente nos recibieron en sus casas y colaboraron con nosotros.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el apoyo económico dado para la infraestructura y equipo adecuado para el estudio de tripletas repetidas en el INISA.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Sistema de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae”



Dr. Ramiro Barrantes Mesén

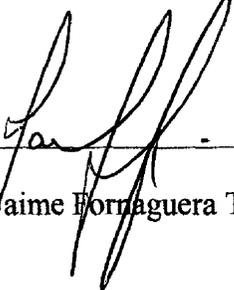
Representante del Decano

Sistema de Estudios de Posgrado (SEP)



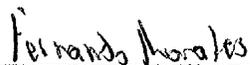
Dra. Patricia Cuenca Berger

Directora de Tesis



Dr. Jaime Fornaguera Trias

Asesor



M.Sc. Fernando Morales Montero

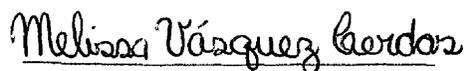
Asesor



Dra. Henriette Raventós Vorst

Representante del Director

Programa Regional Posgrado en Biología



Melissa Vásquez Cerdas

Candidata

INDICE

	Pág.
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Hoja de aprobación	V
Índice	VI
Resumen	VII
Lista de cuadros	IX
Lista de abreviaturas	X
Introducción	1
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Materiales y métodos	31
Resultados	37
Discusión	53
Conclusiones-Recomendaciones	71
Bibliografía	73
Apéndice I	83
Apéndice II	92

Resumen

La Enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del Sistema Nervioso Central (SNC). La prevalencia está estimada entre 5 y 10 personas afectadas por cada 100 000 habitantes entre poblaciones caucásicas.

Se caracteriza por cambios físicos o motores, cognitivos y emocionales, que van desarrollándose de manera gradual. La edad promedio de aparición es cerca de los 40 años (HD clásica). Presenta un patrón de herencia autosómico dominante. El defecto génico consiste en una expansión del trinucleótido repetido CAG (citosina, adenina, timina) en tandem en el exón 1 del gen *IT15* o *HD*; localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3), y que codifica para la proteína citoplasmática huntingtina. La enfermedad se presenta cuando se tienen más de 40 repeticiones del trinucleótido CAG.

El mecanismo molecular exacto que explica cómo ocurren las expansiones, se desconoce por ahora. El tamaño y dirección (expansiones o contracciones) de la inestabilidad son muy diferentes dependiendo del sexo del progenitor afectado. La patología de la HD parece estar restringida al cerebro. Los mecanismos biológicos precisos que llevan a muerte celular en la HD no se comprenden aún completamente.

El objetivo del estudio consistió en determinar el tamaño exacto de la mutación en personas afectadas con la HD y sus familiares mediante el uso de técnicas de biología molecular, con el fin de conocer cómo se está expresando la mutación en las familias costarricenses y así poder ofrecer el consejo genético adecuado y oportuno.

El estudio comprendió el análisis de 38 muestras de sangre pertenecientes a individuos de 4 diferentes familias. De estos 38 individuos, 5 mostraban síntomas de la HD y 33 eran familiares en riesgo. A todos se les realizó el diagnóstico molecular mediante PCR y se logró detectar la mutación en las 4 familias. Se confirmó el diagnóstico clínico en las personas afectadas y se encontraron 11 personas con la mutación, que permanecían asintomáticas.

Nuestros análisis moleculares mostraron un perfil del número de repeticiones CAG que es similar a los reportados en otras poblaciones a nivel mundial. Las mutaciones fueron observadas en un total de 18 individuos y en cuanto al sexo afectado, no hay diferencias

significativas. Tampoco hay diferencias en la transmisión de los alelos expandidos de acuerdo al género del progenitor transmisor.

El análisis de los datos obtenidos mostró que en las 4 familias se observó inestabilidad de la repetición CAG durante la transmisión de una generación a la siguiente, tanto vía materna como paterna. En las transmisiones meióticas que se pudieron documentar en este estudio, los cambios son pequeños, de solamente unas pocas repeticiones CAG (entre 3 y 5 repeticiones). Mientras que en las transmisiones maternas se tiende a las contracciones, en las paternas por el contrario incrementa el número de repeticiones en la siguiente generación.

En cuanto a la edad de inicio de la HD, la mayoría de los pacientes la manifiestan entre la cuarta y quinta década de vida. Se observó también una correlación negativa entre la edad de inicio y el número de repeticiones CAG en el alelo expandido.

Lista de cuadros

	Pág
Cuadro 1. Características de las enfermedades tipo I	5
Cuadro 2. Características de las enfermedades tipo II	6
Cuadro 3. Características moleculares de 18 individuos costarricenses con la mutación HD	46
Cuadro 4. Relación del tamaño de la mutación entre progenitores e hijos(as) en 4 familias costarricenses donde segrega el gen de la HD	49
Cuadro 5. Distribución del número de personas afectadas en 4 familias costarricenses donde segrega el gen de la HD según la edad de inicio de la enfermedad	50
Cuadro 6. Clasificación clínica de pacientes costarricenses con la HD según la edad de inicio y los síntomas clínicos	50
Cuadro 7. Relación entre la edad de inicio de la HD versus el tamaño promedio de la mutación a través de las generaciones en pacientes de 4 familias de Costa Rica	51
Cuadro 8. Intervalos de repeticiones CAG normales y patológicos encontrados en pacientes con la HD en diferentes estudios a nivel mundial	58

Lista de figuras

	Pág.
Fig. 1. Esquema de la localización de tripletas repetidas en diferentes trastornos genéticos	2
Fig.2. Esquema del gen <i>IT-15</i> o <i>HD</i> e intervalos según el número de repeticiones CAG	10
Fig. 3. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	34
Fig. 4. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% teñido con nitrato de plata	35
Fig.5. Genealogía de la familia #1	39
Fig.6. Genealogía de la familia #2	41
Fig.7. Genealogía de la familia #3	43
Fig.8. Genealogía de la familia #4	45
Fig.9. Distribución de repeticiones CAG en alelos mutados de individuos afectados con la HD	47
Fig.10. Distribución de repeticiones CAG en alelos normales de individuos afectados con la HD	48
Fig.11. Relación entre la edad de inicio de la HD y el tamaño de la mutación	51
Fig.12. Relación entre la edad de inicio de la HD y el número de repeticiones en el alelo normal	52

Lista de abreviaturas

3'UTR	Región 3' no codificante de un gen
4p16.3	Brazo pequeño del cromosoma 4, posición 16.3
5'UTR	Región 5' no codificante de un gen
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
Ca ⁺²	Iones calcio
CAG	Citosina, adenina, guanina
CBP	Proteína de unión a CREB
CCG	Citosina, citosina, guanina
CGG	Citosina, guanina, guanina
CREB	Proteína de unión de elemento de respuesta al AMPc
DM1	Distrofia Miotónica tipo 1
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido (forma reducida)
FEN-1	Endonucleasa flap 1
FRAXA	Síndrome del cromosoma X Frágil
FRDA	Ataxia de Friedreich
GABA	Acido gamma-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GLUR6	Subunidad 6 del receptor ionotrópico kainato
HAP1	Proteína 1 asociada a la huntingtina
HD	Enfermedad de Huntington
hE2-25K	Enzima humana de conjugación con la ubiquitina
HIP2	Proteína 2 que interacciona con la huntingtina
HTT	Proteína huntingtina

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
IIN	Inclusiones intraneuronales nucleares
IT15	Gen de la HD (Interesting Transcript 15)
K ⁺	Iones potasio
Kb	Kilo bases
KDa	Kilo Daltons
Mg ⁺²	Iones magnesio
MMR	Sistema de reparación de apareamientos erróneos
MSSN	Neuronas espinosas de tamaño mediano
Na ⁺	Iones sodio
N-COR	Receptor nuclear co-represor
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NES	Señal de exportación nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRSE	Elemento silenciador restrictivo de neuronas
OH [•]	Radicales hidroxilo
O ₂ [•]	Radicales superóxido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PoliQ	Tractos de poliglutaminas
p53	Proteína proapoptótica nuclear de 53 kilodalton
REST/NRSF	Factor citosólico represor de los factores de transcripción
SH3	Sarc homology-3. Dominios homólogos al Src-2 que se unen a secuencias ricas en prolina
SNC	Sistema Nervioso Central
TBP	Proteína de unión a TATA (timina, adenina, timina, adenina)

INTRODUCCIÓN

Las secuencias de ADN repetidas en tándem se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos eucariotas y están localizadas cerca o dentro de las unidades de transcripción (genes). Las tripletas repetidas o trinucleótidos repetidos, como CAG (citosina, adenina, guanina) o CGG (citosina, guanina, guanina), son un tipo de estas secuencias (Cuenca y Morales 1999).

El incremento o expansión en el número de tripletas en estas secuencias repetidas en tándem, representa la base molecular de una lista de enfermedades genéticas humanas, como la Distrofia Miotónica (DM1), el síndrome del Cromosoma X Frágil (FRAXA) y la enfermedad de Huntington (HD) (Cuenca y Morales 1999).

Estas secuencias son inestables y su tasa de mutación está relacionada con el número de repeticiones, así, la mutabilidad de la secuencia después de un cambio en el número de repeticiones difiere de la de su predecesor (Richards y Sutherland 1997). Esto significa que el tamaño de la secuencia repetida varía cuando las células se dividen, tanto en la línea germinal como somática, y tiende a aumentar de una generación a la siguiente (Cuenca y Morales 1999). Por este motivo, a las mutaciones responsables de estas enfermedades se les dio el nombre de mutaciones dinámicas, para diferenciarlas de la tasa de mutación constante que caracteriza a la mayoría de secuencias en el genoma (Richards y Sutherland 1997).

Una cantidad anormal de tripletas repetidas en algunos genes puede: alterar la función del propio gen, de los ARNs o sus productos proteicos, causando enfermedades del sistema nervioso o multisistémicas.

En los últimos años se han propuesto varios modelos para tratar de explicar cómo ocurren las expansiones de las tripletas repetidas, pero por el momento poco se conoce realmente sobre la dinámica de los mecanismos de inestabilidad de estas repeticiones. Aunque el mecanismo exacto se desconoce por ahora, las expansiones podrían ser el resultado de una combinación de los siguientes mecanismos: 1- entrecruzamiento desigual (Jakupciak y Wells 1999); 2- intercambio desigual de cromátidas hermanas; 3- deslizamiento de la doble hélice, “slippage” (Pearson y Sinden 1996); 4- formación de horquillas por parte de los fragmentos de Okazaki (Petruska *et al.* 1998); 5- formación de una estructura secundaria por parte de las tripletas repetidas

resistente a la FEN-1 (endonucleasa flap 1 responsable de remover la porción 5' de los fragmentos de Okazaki) (Gordenin *et al.* 1997).

Además, la mayoría de los trastornos genéticos causados por este tipo de mutaciones dinámicas, presentan el fenómeno de la anticipación genética, que consiste en un incremento en la severidad de los síntomas y una disminución de la edad de aparición de la enfermedad con el paso de las generaciones. Este fenómeno está relacionado con la magnitud de la expansión, cuanto mayor sea el número de repeticiones más graves serán los síntomas y la aparición será más temprana. La magnitud de las expansiones también se ha relacionado con la inestabilidad de la secuencia, de modo que cuanto más repeticiones tiene la secuencia más inestable será (Richards y Sutherland 1997). Las mutaciones inestables o dinámicas resultaron ser también la explicación a nivel molecular de la expresión variable y la penetrancia incompleta que presentan enfermedades como la DM, FRAXA y la HD.

Todos estos trastornos genéticos, no obstante, difieren de la secuencia de la unidad repetida y en la localización de la repetición respecto al gen afectado. Las repeticiones se pueden encontrar tanto en el extremo 5' no codificante del gen, dentro de la región codificante, dentro de un intrón o en el extremo 3' no codificante del gen (Fig. 1) Dada esta diferencia en la localización, el papel del trinucleótido en la etiología molecular de la enfermedad será distinto según la enfermedad. También, dependiendo de la enfermedad, la expansión es inestable preferentemente en la transmisión paterna o materna (Richards y Sutherland 1997).

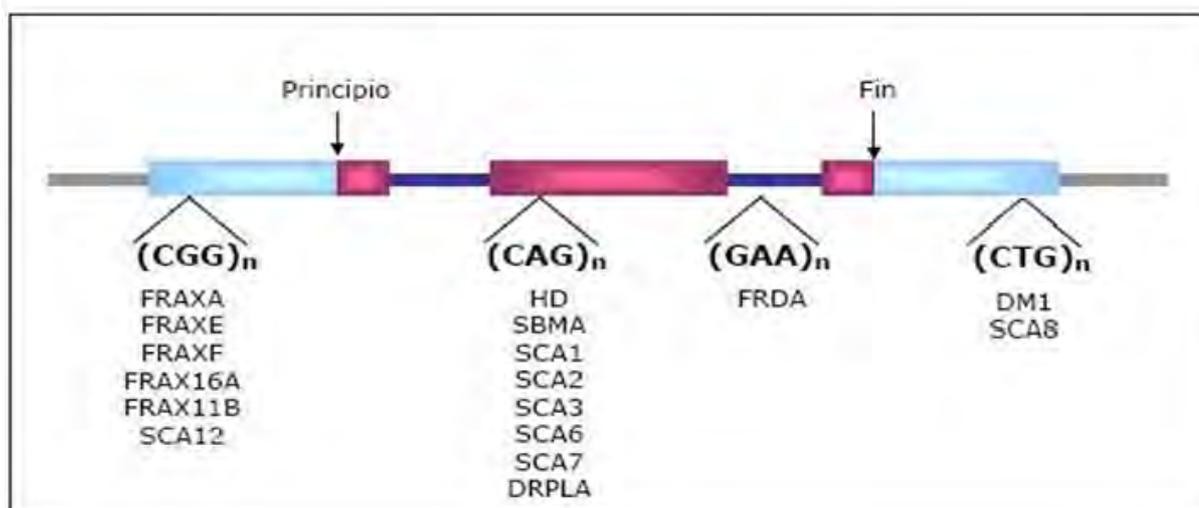


Figura 1. Esquema de la localización de triplete repetidas en diferentes trastornos genéticos (En color celeste se indican las regiones 5' y 3', en color rojo las regiones codificantes y en azul las regiones intrónicas). Adaptado de Sinden *et al.* 2002.

Desde el punto de vista patológico, las enfermedades producidas por trinucleótidos repetidos se dividen en dos grupos: tipo I y II (Reddy y Housman 1997).

Las enfermedades tipo I (Cuadro 1) se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva en diferentes grupos de neuronas, que depende de la edad de aparición y del tamaño de la repetición. La tripleta repetida es CAG y se encuentra siempre en una región codificante del gen respectivo, dando lugar a un fragmento poliglutamínico en la proteína. Debido a que el trinucleotido se encuentra en una zona codificante del gen, el número de repeticiones en los individuos afectados es relativamente pequeño, en general entre 40 y 70 repeticiones. El incremento de tamaño del segmento poliglutamínico se asocia con un cambio significativo en las propiedades físicas de la proteína, la cual adquiere funciones que no tenía. En otras palabras, los mecanismos parecen reflejar una ganancia de función de la proteína normal, provocando toxicidad en las neuronas y llevando eventualmente a neurodegeneración. La enfermedad de Huntington (HD) es una de las más representativas de las enfermedades neurodegenerativas debidas a la expansión de la tripleta CAG en el ADN.

Las enfermedades tipo II (Cuadro 2) presentan una patología multisistémica y más variada. En estos casos, la tripleta que se repite es diferente en cada caso. La expansión de repeticiones se encuentra en regiones no codificantes de los genes (regiones no traducidas o intrones), y por lo tanto, el intervalo de repeticiones es más amplio, desde 50 a miles de repeticiones. Dentro de este grupo encontramos el síndrome del Cromosoma X frágil (FRAXA), la ataxia de Friedreich (FRDA) y la Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1). En el caso de FRAXA y de la DM1, la tripleta repetida está localizada en regiones no traducidas y en la FRDA se encuentra en un intrón. Por lo tanto, se considera que la relación entre expansión de las repeticiones y patología en estas enfermedades reside en el efecto de la repetición en la expresión del gen (inhibición parcial o completa) o en la función del ARNm (alteración en el metabolismo). En los trastornos relacionados con las repeticiones CGG, la metilación del ADN que contiene las repeticiones CGG, provocaría el silenciamiento del gen, pues hay una supresión transcripcional. En la DM1 y en las ataxias espinocerebelares 8 y 12, la localización de la expansión de repeticiones en la región 3' o 5' del gen puede llevar a un procesamiento aberrante del ARNm, limitando la cantidad de mensaje citoplasmático maduro, o a una expresión aberrante de los genes flanqueantes.

En general, las mutaciones inestables se han encontrado dentro o cerca de genes importantes para la función neurológica normal del ser humano y la presencia de la amplificación puede causar: la inactivación del gen, la alteración en el transporte de los ARNm desde el núcleo al citoplasma, la síntesis de un nuevo producto con funciones diferentes a la proteína original, interferencia en la expresión de genes adyacentes.

Desde 1991, y hasta el momento, se han descrito una gran cantidad de loci en el genoma humano con este tipo de mutaciones que causan alguna de las diferentes enfermedades descritas hasta la fecha.

Cuadro 1. Características de las enfermedades tipo I

Enfermedad	Localización cromosómica	Tripleta	# Repeticiones Ambito Normal	# Repeticiones Ambito patológico	Anticipación	Posición	Herencia	Gen	Proteína	Influencia del sexo (padres)
Enfermedad de Huntington (HD)	4p16.3	CAG	6-39	36-250	SI	codifica	AD	IT15	Huntingtina	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-1 (SCA1)	6p23	CAG	6-44	39-83	SI	codifica	AD	ATX1	Ataxina-1	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-2 (SCA2)	12q24.1	CAG	13-33	32- >200	SI	codifica	AD	ATX2	Ataxina-2	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-3 (SCA3) o Machado-Joseph (MJD)	14q32.1	CAG	3-40	41-89	SI	codifica	AD	ATX3 (MJD1)	Ataxina-3	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-6 (SCA6)	19p13.1	CAG	4-20	20-33	No	codifica	AD	CACNA1A	Subunidad α 1A (dep de voltaje) del canal de calcio	ND
Ataxia espinocerebelar Tipo-7 (SCA7)	3p12-13	CAG	4-35	37-306	¿?	codifica	AD	SCA7	Ataxina-7	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-17 (SCA17)	6p27	CAG	25-42	45-63	SI	codifica	AD	SCA17	TBP	ND
Atrofia muscular Espinobulbar (SBMA) ó Enfermedad de Kennedy	Xq11-12	CAG	9-36	38-65	SI	codifica	X-recesiva	AR	Receptor Andrógenos (AR)	ND
Atrofia dentatorubral-Palidoluisiana (DRPLA)	12p13.31	CAG	3-36	49-88	SI	codifica	AD	DRPLA(B37)	Atrofina -1 (drplap)	Paterna

AD: autosómica dominante ; AR: Autosómica recesiva ; X: ligada al cromosoma X ; 5' NC: Extremo 5' no codificante del gen, ND: no se ha documentado.

Cuadro 2. Características de las enfermedades tipo II

Enfermedad	Localización cromosómica	Tripleta	# Repeticiones Ambito Normal	# Repeticiones Ambito Patológico	Anticipación	Posición	Herencia	Gen	Proteína	Influencia del sexo (padres)
Síndrome X frágil A (FRAXA)	Xq27.3	CGG	6-60	60-200 pre >200 afec	SI	5'NC	X-dominante	FMR1 (FRAXA)	FMRP	Materna
Síndrome X frágil E (FRAXE)	Xq28	GCC	4-39	26-200 pre > 200-900 afec	SI	5'NC	X-dominante	FMR2 (FRAXE)	Proteína FMR2	ND
Distrofia miotónica Tipo 1 (DM1)	19q13.3	CTG	5-37	50->1000 afec	SI	3'NC	AD	DMPK	Miotonina	Materna
Ataxia de Friedreich (FRDA)	9q13	GAA	6-32	80-99 pre 200-1700 afec	No	Intrón 1	AR	X25	Frataxina	Materna
Ataxia espinocerebelar Tipo 8 (SCA8)	13q21	CTG	2-44	45-110 interm > 110 afec	No	3'NC	AD	SCA8	ARN antisentido	Materna
Ataxia espinocerebelar Tipo- 12 (SCA12)	5q31-33	CAG	7-45	55-93	¿?	5'NC	AD	PPP2R2B	Reguladora de PP2A	Paterna
Enfermedad similar a Huntington tipo 2	16q24.3	CTG	7-28	66-78 afec	Si?	Exón 1	AD	JPH3	Juntofilina 3	ND
Distrofia muscular oculofaríngea	14q11	GCG	6	8-13 afec	No	Codifica	AR AD	PABP2	Proteína 2 que enlaza a poliadeninas	ND

pre: premutación; afec: afectados; interm: alelos intermedios; AD: autosómica dominante; AR: Autosómica recesiva; X: ligada al cromosoma X; 3'NC: extremo 3' no codificante del gen; 5' NC: Extremo 5' no codificante del gen; ND: no se ha documentado.

Enfermedad de Huntington (HD)

Como ya se mencionó, una de las enfermedades causadas por la expansión de un trinucleótido repetido es la enfermedad de Huntington (HD). Se le llamó así porque fue descrita por el médico americano George Huntington (1850-1916) en 1872, aunque también es conocida como Corea (en griego significa danza) y durante mucho tiempo se le ha llamado " El mal o baile de San Vito ". Huntington hizo la primera descripción clínica completa y clara de una enfermedad familiar, cuyos pacientes había estudiado junto a su abuelo y su padre en Long Island, Nueva York. El seguimiento familiar de los afectados condujo posteriormente hasta dos hermanos, que en 1630 partieron con sus familias desde Essex (Sureste de Inglaterra) hacia Boston. En los tres siglos siguientes, unos 1.000 descendientes padecieron la enfermedad; muchos de ellos fueron acusados de brujería, al interpretarse los movimientos anormales como «burla a Jesucristo en la cruz» (Kremer 2002).

Es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del Sistema Nervioso Central (SNC), afecta áreas determinadas del cerebro, específicamente corteza cerebral y estriado, donde las neuronas van degenerándose y finalmente mueren. La HD es uno de los trastornos hereditarios del cerebro más frecuentes. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante y el riesgo de transmitir el gen a la descendencia es de un 50%. Además presenta penetrancia completa: todos los individuos que hereden el alelo mutado eventualmente desarrollarán la enfermedad, a menos que mueran de otras causas antes del inicio de los síntomas (Gusella y Young 1993).

Se encuentra en todos los grupos étnicos y la prevalencia está estimada entre 5 y 10 personas afectadas por cada 100 000 habitantes, entre poblaciones de Europa Occidental y descendientes de estas poblaciones (poblaciones caucásicas) (Harper 1992). Sin embargo, hay pequeñas áreas de prevalencia alta y baja. Estas diferencias en la frecuencia se relacionan con los orígenes étnicos de estas poblaciones particulares y con los de la HD en ese país (Martín-Aparicio y Lucas 2002). Por ejemplo, en Africa la prevalencia es baja ($<0.01/100\ 000$) y también han sido reportadas tasas bajas en Japón ($0.11-0.45/100\ 000$) y en China ($0.2-0.4/100\ 000$) (Harper 1992). Los grupos con mayor prevalencia se encuentran en la región de Zulia (Noroeste de Venezuela, junto al lago Maracaibo) donde el 40% de la población está en riesgo, al menos hay 1000 personas mostrando síntomas y otros 3000 más son presintomáticos (Wallerstein 2000) y en la isla de Tasmania (Sur de Australia) ($12/100\ 000$) (Hayden 2000).

Manifestaciones Clínicas

La sintomatología característica de la enfermedad consiste en disfunción motora, cambios cognitivos y cambios emocionales. Dichos cambios van desarrollándose de manera gradual, hasta convertirse en problemas muy severos después de unos años (Guízar 1994). Dentro de los cambios motores los síntomas más característicos son los movimientos coreicos, que son rápidos e involuntarios, empeoran con el estrés y no pueden ser suprimidos voluntariamente por el paciente. Estos movimientos son las manifestaciones iniciales en la mayoría de los pacientes y pueden comenzar como pequeñas fasciculaciones de los dedos o los músculos faciales (gesticulaciones) e involucran movimientos de las extremidades y del tronco conforme la enfermedad progresa. Durante el curso de la enfermedad, los movimientos pueden interferir con la marcha (pasos), el habla, la masticación y deglución (disfagia) y otros aspectos de la función motora asociados con actividades de la vida diaria. Pueden existir además movimientos anormales de los ojos y dificultades del seguimiento ocular. Sin embargo, el deterioro de los movimientos puede variar sustancialmente en diferentes personas; así por ejemplo, algunas presentan pocos movimientos involuntarios (principalmente en pacientes con un inicio temprano de la HD) o ninguno (akinesia). Conforme avanza la enfermedad, características como bradiquinesia (lentitud para moverse), rigidez y distonia llegan a ser obvias y los movimientos coreicos pueden disminuir (Myers *et al.* 1999a). La distonia, se caracteriza por movimientos anormales lentos y posturas anormales, como cuello torcido, espalda arqueada o gestos faciales. La distonia por lo general llega a empeorar y a ser una característica prominente en los estados tardíos de la enfermedad (Hayden 2000).

Las funciones cognitivas generalmente solo se afectan en los estadios más avanzados. Puede haber una disminución de la memoria reciente y además se reduce la habilidad para planificar actividades, integrar nuevos conocimientos o poder ocuparse eficazmente de situaciones nuevas. Entre los síntomas de la HD figuran también cambios emocionales o de personalidad, como cambios de humor, depresión, ansiedad, apatía, comportamiento agresivo y otros problemas psiquiátricos (Hayden 2000). Finalmente, el paciente muere postrado en una cama, no por la enfermedad en sí misma, sino por complicaciones asociadas como la neumonía (33%), problemas coronarios (24%), obstrucción de la vía aérea, trauma como consecuencia de una caída o infecciones, que se presentan por el débil estado del organismo (Kremer 2002 y Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Edad de manifestación

La edad de inicio o de manifestación es la edad cuando aparece el primer signo que representa un cambio permanente con respecto al estado normal (Hayden 2000).

La edad de manifestación de la HD es altamente variable y la incidencia en ambos sexos es probablemente la misma. Por lo general se presenta entre los 30 y 50 años de edad (HD clásica), edad a la cual muchas personas ya se han reproducido y han formado sus familias, por eso se dice que es una enfermedad de manifestación tardía (Myers *et al.* 1988).

Ocasionalmente (5%-10% de los casos), la HD inicia antes de los 20 años de edad (HD juvenil o enfermedad de Westphal) típicamente manifestándose con síntomas más severos, incluyendo: rigidez desde el principio, mayor probabilidad de convulsiones, frecuentes ataques epilépticos, un curso de la enfermedad más rápido y menor tiempo de vida (8 años). Aproximadamente 20% de los casos se presentan después de los 50 años de edad y la enfermedad progresa más lento de lo usual (Alonso *et al.* 1997 y Fernandes 2001). Los casos más tempranos que han sido reportados corresponden a edades de 2 y 3 años, mientras que los más tardíos a los 80 años ó más (Myers *et al.* 1999a).

La HD es invariablemente fatal, sin períodos de remisión (atenuación momentánea de los síntomas de una enfermedad) y el intervalo promedio desde el inicio de los síntomas hasta la muerte oscila entre los 15 y los 20 años, sin diferencia entre los sexos (Myers *et al.* 1988, Alonso *et al.* 1997). Pese a haber grandes diferencias con respecto al comienzo de la enfermedad, no hay variaciones tan grandes con respecto a su duración (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Mutación responsable de la HD

En 1983 Gusella y colaboradores, mediante el empleo de marcadores polimórficos de ADN, localizaron el gen de la HD en la región cromosómica 4p16, que posteriormente tras el empleo de más marcadores se refinó la zona a 4p16.3 (Gusella *et al.* 1983).

Después de unos 10 años de investigación genética molecular, en 1993, se descubrió que el defecto génico es una expansión del trinucleótido CAG (Citosina, Adenina, Guanina) (Anónimo 1993) cerca del extremo 5', en el exón 1 (región codificante) del gen inicialmente llamado IT15 (interesting transcript 15) y ahora

llamado gen *HD*, localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Las expansiones son traducidas en un segmento de poliglutamina (poliQ) cerca del amino terminal (Myers *et al.* 1999a).

La secuencia del gen muestra que éste comprende 170 Kb de ADN genómico, con 67 exones y es expresado como dos principales transcritos de ARNm (13.5kb y 10.5kb debido a diferencias en la poliadenilación, en el tamaño de la 3' UTR) que codifican para la proteína que ha sido llamada Huntingtina (HTT), con 3144 aminoácidos y peso molecular de 349 KDa (Jones *et al.* 1997).

El gen *HD* del humano y del ratón son 90% homólogos en la región codificante predicha con un alto grado de identidad en la secuencia de las regiones 5' y 3' UTRs (Myers *et al.* 1999b).

Los individuos normales poseen de 6 a 35 repeticiones CAG. Los individuos con la HD poseen más de 36 repeticiones CAG (Fig.2). El alelo HD expandido más grande que se ha encontrado hasta la fecha posee 250 repeticiones en un paciente con HD juvenil (Nance *et al.* 1999 y Potter *et al.* 2004). Sin embargo, alelos con más de 80 repeticiones CAG son extremadamente raros. Se han reconocido 4 intervalos o categorías según el número de repeticiones CAG, asociados con riesgos variables de la enfermedad (Potter *et al.* 2004)



Figura 2. Esquema del gen *IT-15* o *HD* e intervalos según el número de repeticiones CAG. Adaptado de Potter *et al.* 2004.

A. ALELOS NORMALES: alelos con ≤ 26 repeticiones CAG

Las personas no desarrollan la HD, ni tampoco hay datos de alguna persona que haya heredado la HD de algún progenitor con una repetición en este intervalo.

B. ALELOS NORMALES MUTABLES: alelos con 27 a 35 repeticiones CAG

También se les conoce como intervalo de inestabilidad meiótica o alelos intermedios. No hay reportes de personas con repeticiones en este ámbito que expresen la HD. Pero sí hay un pequeño porcentaje de casos confirmados de inestabilidad meiótica transmitida paternalmente, esto significa que los alelos son meióticamente inestables en esperma y por lo tanto padres con repeticiones en este intervalo han heredado a sus hijos un alelo expandido en el intervalo clínico y éstos han desarrollado la HD; pero no hay casos de inestabilidad meiótica materna en este ámbito. La probabilidad de que la transmisión de un alelo en este intervalo produzca una expansión en el intervalo clínico depende de varios factores, incluyendo el sexo del individuo que lo transmite, el tamaño del alelo, la configuración molecular de la región alrededor de las repeticiones CAG y su haplotipo. El riesgo puede ser tan alto como 6% a 10% para alelos paternos llevando 35 repeticiones CAG (Goldberg *et al.* 1995 y Chong *et al.* 1997).

C. ALELOS HD CON PENETRANCIA REDUCIDA O INCOMPLETA: alelos con 36 a 39 repeticiones CAG

Las repeticiones en esta categoría son raras. Alelos con repeticiones en este intervalo están asociados con un fenotipo HD, sin embargo, en algunos casos, estos alelos han sido encontrados en individuos asintomáticos de hasta 90 años. Dicho de otra manera, no todas las personas con repeticiones en este intervalo muestran las características de la enfermedad.

Hay evidencia de que la penetrancia incrementa conforme aumentan los tamaños de los alelos (# de repeticiones) en este intervalo. La penetrancia ha sido estimada en 25% para 36 repeticiones, 50% para 37, 75% para 38 y 90% para 39 repeticiones (Myers *et al.* 1999a). Sin embargo, estos porcentajes de penetrancia son subestimados debido al pequeño número de casos que se han reportado en este intervalo, además de

que muchos de los reportados son personas quienes desarrollaron la HD, mientras que aquellos que no manifiestan los síntomas pueden escapar de la detección (Myers 2004).

La observación de que no hay diferencia en la secuencia de las repeticiones entre aquellos que expresan la enfermedad y los que no, implica que factores modificadores incluyendo modificadores genéticos, influyen en la penetrancia del alelo HD y por lo tanto en la expresión de la enfermedad (McNeil *et al.* 1997).

Hay varios casos de inestabilidad meiótica transmitida paternalmente, en los cuales, descendientes de padres que presentan repeticiones en este intervalo, han heredado un alelo expandido en el intervalo clínico.

D. ALELOS HD CON PENETRANCIA COMPLETA: alelos con ≥ 40 repeticiones CAG

Todas las personas con repeticiones en este ámbito desarrollan la HD. Los descendientes de personas con repeticiones en este intervalo tienen un 50% de riesgo de heredar el gen causante de la enfermedad.

Según estos intervalos, vemos entonces que, los alelos más pequeños entre las personas enfermas están entre las 36 y las 40 repeticiones, mientras que los alelos más grandes observados en un individuo normal presentan 39 repeticiones CAG. Por lo tanto, hay un área de traslape (de 36 a 39 repeticiones) en el tamaño de las repeticiones CAG, que representa el intervalo de penetrancia reducida o incompleta (Myers *et al.* 1999a).

Un pequeño número de casos de la HD son esporádicos, es decir, ocurren aunque no haya una historia familiar de la enfermedad. Se cree que estos casos son debidos a una nueva mutación genética (mutación de *novo*): una alteración en los genes que ocurre durante la gametogénesis y que convierte el número de repeticiones CAG en el requerido para causar la enfermedad (Myers *et al.* 1999a, Hayden 2000). Para decir que se trata de una mutación de *novo* se deben cumplir varios criterios: que los padres del caso esporádico hayan vivido más allá de la edad esperada de inicio de la HD sin ninguna manifestación de la enfermedad, la paternidad del caso esporádico debe ser confirmada y la enfermedad debe ser transmitida a la proge de del caso esporádico (Hayden 2000). Varios factores están relacionados con las mutaciones de *novo*:

transmisión paterna y el tamaño de la expansión en el alelo precursor o parental (Myers *et al.* 1999a).

En la HD se ha reconocido un haplotipo que se presenta en 1/3 de los cromosomas portadores y que ha sido asociado con 2 polimorfismos:

Los trinucleótidos repetidos CAG, que son expandidos en los cromosomas portadores, están localizados cerca del extremo 5' del gen *HD* en el 4p16.3, adyacentes a un arreglo de codones CCG que codifican para prolina (Anónimo 1993). La mayoría de los alelos afectados (más del 90%), poseen 7 repeticiones CCG, (Rubinsztein *et al.* 1993, Andrew *et al.* 1994) mientras que el número de repeticiones CAG es altamente polimórfico (Anónimo 1993).

Otro polimorfismo genético que fue identificado cerca del tracto CAG fue la delección del codón $\Delta 2642$ en el exón 58 (Vuillaume *et al.* 1998). La combinación de 7 repeticiones de prolinas más la delección del codón $\Delta 2642$ está asociada con los alelos HD más grandes (Myers *et al.* 1999a). Muchos estudios han demostrado que existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre la mutación de la HD y ambas regiones polimórficas: el segmento rico en CCG y la delección $\Delta 2642$ (Vuillaume *et al.* 1998). Estos polimorfismos podrían influenciar la estabilidad de las repeticiones o la expresión de la enfermedad (variación en la edad de inicio, heterogeneidad clínica) (Vuillaume *et al.* 1998, Myers *et al.* 1999a).

Anticipación genética

Debido a la correlación clínica entre el tamaño de la expansión y la edad de manifestación, en esta enfermedad se presenta el fenómeno de anticipación genética, en el cual las manifestaciones clínicas se presentan a edades más tempranas a través de las generaciones en una misma familia, es decir, los descendientes presentan síntomas a una edad menor a la del progenitor afectado y la severidad de la enfermedad se ve incrementada (Myers *et al.* 1999a).

Expresividad variable

La expresividad de un gen es el grado en el cual un fenotipo es expresado en un individuo. La HD presenta expresividad variable, esto significa que la *severidad o intensidad* de los síntomas puede variar entre individuos, incluso en una misma familia,

y correlaciona en la mayoría de los casos en forma positiva o directa con el número de repeticiones de la triplete CAG (Myers *et al.* 1999a).

Inestabilidad del trinucleótido CAG

El sexo del progenitor afectado tiene el impacto más fuerte sobre la inestabilidad del trinucleótido CAG. Esto significa que el tamaño de la repetición depende de la forma en la que ocurrió la transmisión dentro de la familia, es decir, si la mutación fue heredada por parte del padre o de la madre (MacDonald *et al.* 1993).

Aunque la inestabilidad transmitida maternalmente es tan común como la transmitida paternalmente, el tamaño y dirección (expansiones o contracciones) de la inestabilidad son muy diferentes dependiendo del sexo del progenitor afectado. Para las transmisiones maternas, se han visto iguales números de expansiones y contracciones. La mayoría de los cambios están entre 1 y 3 repeticiones. En contraste, en las transmisiones paternas son más frecuentes las expansiones (Myers 2004) y en algunos casos los saltos en el tamaño pueden ser dramáticos, incluso doblando el número de repeticiones. Este fenómeno es evidente en alelos con repeticiones CAG expandidas representadas en el esperma de muchos pacientes con la HD (MacDonald *et al.* 1993).

Mientras la base de su inestabilidad no se conoce, hay evidencias para argumentar que el evento crítico ocurre en la meiosis durante el proceso de gametogénesis (Leefflang *et al.* 1995). Una explicación para este fenómeno es que la expansión de las triplete está favorecida por la división celular, más frecuente en la producción de espermatozoides que en la de óvulos, por lo que hay mayores posibilidades de que ocurran errores genéticos (Telenius *et al.* 1993). No está claro si la ausencia de grandes saltos en el tamaño de la repetición durante la transmisión en las mujeres es debido a la ausencia de un mecanismo similar durante la ovogénesis o a que algunos eventos quizás son letales y por lo tanto no resultan en progenie viable (Myers *et al.* 1999a).

Transmisión parental de la repetición CAG

Se ha visto que todos los individuos que heredan la enfermedad de su padre, tienen una probabilidad estadística 10 veces mayor de desarrollar la enfermedad varios años antes, que aquellos que la heredan de su madre (Gusella y Young 1993). Aproximadamente el 75%-80% de los casos juveniles (antes de los 20 años) han heredado la enfermedad del padre (Guízar 1994).

¿Cómo se explican estas observaciones? Hay ciertos mecanismos hereditarios que no se ajustan a las formas clásicas de herencia, como la impronta genómica, mediante la cual se observa diferente expresión del material génico dependiendo de si proviene del padre o de la madre (Guízar 1994). Esto puede ser debido a diferencias en la metilación de los genes en los dos sexos, dando como resultado diferencias en la expresión del gen, ya sea que se exprese antes (edad de inicio) o con mayor intensidad (severidad) cuando es transmitido por el padre. Se ha visto que algunos elementos repetitivos en muchos cromosomas del ratón se metilan de manera diferente en los machos y en las hembras (Myers *et al.* 1985).

Otro factor que ha sido propuesto para explicar estos resultados, son ciertos factores protectores maternos mediados a través de la mitocondria u otras influencias citoplasmáticas. En algunos casos los pacientes con la HD juvenil pueden tener signos y síntomas antes de la manifestación clínica en sus padres, dando la impresión de que la enfermedad saltó una generación (Guízar 1994).

Producto Génico: Huntingtina (htt)

La htt es una proteína de expresión ubicua. Se expresa altamente en cerebro (células neurales) y en una amplia variedad de tejidos no neurales (testículos, ovarios, pulmón, hígado e intestino), a través del desarrollo (sugiere que es importante en la maduración de neuronas) y en el adulto (Schilling *et al.* 1995). Sin embargo, la expresión de la htt disminuye (downregulated) en tejido no neural, mientras que en neuronas la htt continua siendo expresada en niveles altos (Myers *et al.* 1999b). Presenta una localización citoplasmática en la mayoría de las células somáticas (Schilling *et al.* 1995).

El gen *HD* mutante se expresa en el cerebro en niveles comparables con los del gen *HD* normal desde los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Las neuronas piramidales corticales y fundamentalmente las de las capas que dan lugar a proyecciones cortico-estriatales, contienen de un modo uniforme niveles altos de htt (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Dentro de las neuronas, la htt se encuentra fundamentalmente en el citoplasma, asociada con membranas o citoesqueleto en el soma o cuerpo celular, dendritas, axones y terminales nerviosas (Gutekunst *et al.* 1995 y Martín-Aparicio y Lucas 2002).

La htt parece no tener homología significativa con otras proteínas conocidas, sin embargo, muestra un amplio grado de conservación de la secuencia a través de las

especies, por ejemplo entre la htt del humano y la del ratón hay una identidad del 91%, lo cual sugiere que la función normal de la htt es esencial (Myers *et al.* 1999a).

En cuanto a su función, la htt no muestra dominios hidrofóbicos que sugieran regiones transmembrana (Schilling *et al.* 1995). La porción N-terminal de la huntingtina contiene trectos de poliglutaminas y poliprolinas, típicamente asociados con factores de transcripción. Sin embargo, basados en su predominante localización citoplasmática y en su gran tamaño, es poco probable que ésta sea un factor de transcripción. Aunque es posible que la htt pueda modular la transcripción si parte de la proteína entra al núcleo (Nasir *et al.* 1996).

Las funciones fisiológicas y bioquímicas de la htt no se conocen aún, sin embargo estudios recientes han dado algunas pistas acerca de la función normal del gen de la htt. A nivel subcelular la htt se encuentra asociada frecuentemente con microtúbulos y también se ha detectado que interactúa con proteínas asociadas con vesículas de membrana y con proteínas del citoesqueleto, lo cual sugiere que ésta podría jugar un papel importante en la endocitosis, el tráfico intracelular y el reciclaje de membranas (Martín-Aparicio y Lucas 2002). Otros estudios revelan que ratones homocigotas para mutaciones nulas de htt (delección del gen) mueren en fase de embriogénesis temprana (cerca del día embrionario 7.5), lo cual muestra que esta proteína podría desempeñar un papel crucial en el desarrollo embrionario normal y particularmente en la gastrulación normal (Hayden 2000 y Martín-Aparicio y Lucas 2002).

La expansión de un trinucleótido repetido podría mediar su efecto a nivel de ADN, ARN o de proteína. Parece que en las enfermedades asociadas con la expansión CAG, la traducción de la proteína es un requisito crítico para el desarrollo del fenotipo (Nasir *et al.* 1996). El hecho de que el fenotipo de la HD sea completamente dominante (los homocigotos no son más severamente afectados que los heterocigotos), sugiere que la mutación HD no puede causar la inactivación o pérdida de función de una proteína esencial o la homocigocidad sería letal. Por el contrario, parece que la mutación HD provoca una ganancia o adquisición de función de la proteína (Gusella y Young 1993).

Una "ganancia de función" de la proteína significa que la proteína está cumpliendo su función normal en el cuerpo pero además está haciendo algo extra. Parece ser que hay un efecto tóxico de los tramos de poliQ, los cuales alteran la forma de la proteína mutante confiriéndole propiedades nuevas; como interacciones nuevas o

modificadas con otras proteínas intracelulares (Martín-Aparicio y Lucas 2002 y Cattaneo *et al.* 2003).

La mayor parte de las evidencias a favor de la ganancia de función en la HD se derivan de los estudios genéticos que demuestran que los pacientes heterocigotos para la mutación de la HD presentan el espectro completo de fenotipo patológico, y que éste no es clínicamente más agudo en las personas homocigotas para el gen de la HD (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Otra prueba a favor de la hipótesis de ganancia de función tóxica en la HD es el hecho de que los embriones *knockout* homocigotas (disrupción de ambos alelos) para la *htt* mueren cerca del día embrionario 7.5, como se mencionó anteriormente, mientras que pacientes con la HD homocigotas, alcanzan la edad adulta. Los ratones *knockout* heterocigotas, con solo la mitad del alelo normal de la *htt*, superan el estadio embrionario, alcanzan la edad adulta y presentan un fenotipo normal (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

En otro trabajo se combinan ratones *knockout* y ratones *knockin* a los que se les ha modificado el alelo con 50 repeticiones CAG. Este estudio demostraba que una copia del gen de la *htt* es suficiente para el correcto desarrollo cerebral, independientemente de la longitud de las CAG, de modo que la *htt* mutante puede sustituir a la *htt* normal en este estadio (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Otro punto a favor de esta hipótesis es la presencia de los ARNm de alelos normales y mutados en el cerebro de pacientes con la HD, es decir, no se da la pérdida de expresión de un alelo (Schilling *et al.* 1995).

Neuropatología

La neuropatología de la HD es extremadamente restringida al cerebro. La característica principal es que se produce fundamentalmente una atrofia del cuerpo estriado: núcleo caudado y putamen (importantes en el control del movimiento coordinado) y en menor medida una atrofia de la corteza cerebral (controla el pensamiento, la percepción y la memoria) (Vonsattel *et al.* 1985).

Con respecto a la atrofia cortical, principalmente se ven afectadas las capas III, V y VI. Las neuronas más afectadas en la corteza son las neuronas piramidales grandes de proyección (Martín-Aparicio y Lucas 2002). Los pacientes con la HD, generalmente presentan un grado moderado de atrofia en las circunvoluciones de las regiones frontal y temporal (Young 1998). Algunas de las neuronas conservadas presentan aumento de la

arborización dendrítica, lo cual refleja su plasticidad, en un intento de compensar la pérdida de otras células (Martínez y Rábano 2002).

El estriado se localiza en el cerebro anterior y pertenece al sistema motor subcortical de los ganglios basales (acúmulos de neuronas cerebrales no corticales cuyas neuronas contribuyen con impulsos excitatorios e inhibitorios, los cuales ejercen su influencia sobre la vía de los ganglios basales, el tálamo y la corteza cerebral, interviniendo así en la regulación de las funciones motoras, es decir, en el control del movimiento coordinado). Este sistema de los ganglios basales está formado por el estriado (caudado y putamen), el núcleo subtalámico, el globo pálido (segmentos interno y externo) y la sustancia negra (pars compacta y pars reticulata) (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

La atrofia del estriado produce dilatación de los ventrículos laterales visible en estudios de neuroimágenes. Además, en los casos avanzados, hay atrofia global del cerebro con una reducción de un 25-30% de su peso. La patología ha sido clasificada por Vonsattel *et al* (1985) dependiendo del grado de atrofia estriatal, desde grado 0 (sin cambios) a grado 4, estos grados se correlacionan con el tiempo de evolución de la enfermedad, la gravedad clínica y el grado de pérdida neuronal y gliosis (Martínez y Rábano 2002). En el grado 1, el 50% de las neuronas del núcleo caudado se pierden, y el putamen y estriado ventral se encuentran relativamente preservados. En el grado 4, casi no hay neuronas en el estriado dorsal, mientras que las neuronas en el estriado ventral están todavía relativamente preservadas (Vonsattel *et al.* 1985). El grado 4 está asociado con pacientes que se encuentran en el estado final de la enfermedad, quienes están postrados en una cama (Myers *et al.* 1988).

Microscópicamente la patología estriatal se caracteriza por pérdida neuronal, gliosis y presencia de agregados proteicos. Hay una pérdida neuronal selectiva en el cuerpo estriado, ya que las neuronas espinosas de tamaño medio (MSSN), que constituyen el 95% de las neuronas estriatales, son las más vulnerables a la neurodegeneración (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

En las neuronas espinosas, se han observado dos tipos de cambios, cada uno afectando a las dendritas de las células nerviosas. Las dendritas, que se encuentran en cada célula nerviosa, se extienden fuera del cuerpo de la célula y son las responsables de recibir los mensajes de otras células nerviosas. En las etapas intermedias de la HD, las dendritas crecen sin control. En algunos casos, debido a su formación incompleta, las dendritas no llegan a sus destinos. En etapas avanzadas de la enfermedad los

cambios degenerativos causan que secciones de dendritas se engrosen, se rompan o desaparezcan. Se cree que estas alteraciones pueden ser un intento de la célula para reconstruir los contactos de las neuronas perdidos al comienzo de la enfermedad. Pero estas nuevas conexiones de las dendritas pueden contribuir también a la muerte de la célula nerviosa.

En condiciones normales, las MSSN funcionan apagando las señales excitadoras de la corteza motora, la estructura cerebral que dicta el movimiento. Cuando mueren, la corteza motora se torna hiperactiva, lo que precipita la aparición de movimientos involuntarios (Cattaneo *et al.* 2003).

Los patrones de expresión del ARNm y de la proteína no proveen ninguna pista sobre las causas de la muerte neuronal selectiva. Dentro del SNC, no hay un enriquecimiento de HTT en el estriado, que es donde se producen las primeras lesiones, comparado con otras regiones cerebrales. Una razón de la degeneración neuronal selectiva en la HD podría ser que el procesamiento específico de la HTT varíe entre diferentes regiones del cerebro y que se de la generación de clivaje proteolítico de la HTT en células específicas (MSSN), con la posterior translocación del fragmento N-terminal al núcleo de dichas células. Por el contrario, en otras neuronas estriatales y en otras regiones del cerebro, no hay presencia de HTT en el núcleo (Hayden 2000). Otra explicación se basa en moléculas que se expresen específicamente en el cuerpo estriado y que pueden interactuar con la HTT (Cattaneo *et al.* 2003).

En recientes estudios se ha visto que la huntingtina normal, pero no la mutada, estimula la transcripción del gen que codifica el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en las neuronas corticales que establecen sinapsis con las GABAérgicas estriatales, a las cuales aporta este factor trófico que les permite mantener su fenotipo y funcionalidad. El mecanismo por el cual la huntingtina consigue activar el gen del BDNF es a través de su acción sobre un elemento denominado elemento silenciador restrictivo de neuronas (NRSE), que está en la zona promotora del gen del BDNF, entre otros (Zuccato *et al.* 2003).

La huntingtina normal secuestra en el citoplasma, el factor citosólico represor de los factores de transcripción: REST/NRSF (Repressor element-1 transcription factor / neuron restrictive silencer factor), que al estar con la huntingtina unida no puede unirse al NRSE. De esta manera, la huntingtina normal inhibe la actividad silenciadora del NRSE, o sea, NRSE se mantiene activo y se estimula la transcripción del BDNF. Cuando la huntingtina es anormal no se une al factor citosólico (REST/NRSF), por lo

que éste viaja libremente al núcleo donde se une al NRSE y bloquea definitivamente los genes bajo su control. De este modo, la carencia del BDNF, que es un factor esencial para mantener el fenotipo neural GABAérgico, origina la pérdida y degeneración de este tipo de neuronas. Este elemento regulador (NRSE) está ampliamente distribuido en otros genes neurales y por lo tanto la huntingtina puede tener efectos mucho más amplios sobre la transcripción de otras proteínas, aunque la pérdida de las neuronas gabaérgicas sea una de las más evidentes (Zuccato *et al.*2003).

En el cerebro de pacientes con la HD, las neuronas estriatales y corticales contienen agregados citoplasmáticos e inclusiones intraneuronales nucleares (IIN) características. Las IIN son inmunoreactivas a los anticuerpos contra el N-terminal de la HTT-pero no al segmento interno o C-terminal, lo cual sugiere que la formación de las IIN es precedida por el clivaje de la HTT (Martín-Aparicio y Lucas 2002). Las IIN son también inmunorreactivas a la ubiquitina, sin embargo la inmunorreactividad contra la ubiquitina aparece más tarde que la inmunorreactividad contra la HTT, lo cual sugiere que la ubiquitinación es una consecuencia de la formación de las IIN (Myers *et al.* 1999b). También las INN colocalizan con subunidades del proteosoma (Martin 1999).

La huntingtina normal es una proteína que se localiza principalmente en el citoplasma, pero en diferentes estudios se han visto niveles elevados de huntingtina mutante de longitud completa y fragmentos proteolíticos amino-terminales que se acumulan en el núcleo de las neuronas afectadas en la HD. La presencia de HTT tanto en el núcleo como en el citoplasma sugiere que esta proteína puede desplazarse entre estos dos compartimentos celulares. Xia *et al.* (2003) demostraron que la huntingtina tiene una señal de exportación nuclear (NES) en el carboxilo terminal, que es estrictamente conservada entre las diversas especies.

La degradación intracelular de muchas proteínas involucra su conjugación con la ubiquitina y el editaje enzimático de aminoácidos constituyentes en el proteosoma (estructura celular con forma de cámara cilíndrica que contiene peptidasa y cuya función es destruir proteínas deterioradas o tóxicas). Se cree que las IIN en la HD son el resultado de un procesamiento defectuoso en la degradación de la HTT mutada (el proteosoma no puede deshacerse de la HTT mutante) que involucra el transporte de fragmentos truncados de HTT mutante, ubiquitina y otros componentes del proteosoma, al núcleo, donde los agregados o IIN son encontradas solamente en células que son afectadas (Martin 1999).

Se han propuesto 3 mecanismos bioquímicos para la agregación. El primero propone que los agregados de HTT mutante se forman gracias a la acción de la transglutaminasa. La HTT y otras proteínas con poliQ pueden, *in vitro*, sufrir transglutaminación, con lo que se forman así uniones covalentes vía enlaces isopeptídicos glutamina-lisina, pero no se sabe si esos agregados covalentes se forman también *in vivo*. El segundo mecanismo propuesto es la agregación de la HTT dependiente de dominios SH3 (Sarc homology 3), mediada por sus motivos ricos en prolina. Finalmente las poliglutaminas pueden actuar como atracciones polares en forma de zippers, que se unen mediante puentes de hidrógeno entre sus grupos amida formando estructuras de horquillas estables, que a su vez crean hojas de lámina β (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Varios modelos celulares y animales para la HD han revelado que las IIN preceden los síntomas neurológicos y la neurodegeneración. Las IIN pueden afectar la función del núcleo y la expresión de genes importantes para la función neuronal (Li 1999).

Neuroquímica

En la HD las MSSN que contienen GABA (neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico), sustancia P y encefalinas parecen ser las más afectadas (Hayden 2000). En pacientes con la HD, los niveles del neurotransmisor GABA se ven reducidos y los receptores GABA son menos frecuentes en los ganglios basales (estriado y sustancia nigra). El neurotransmisor acetilcolina está también reducido en los ganglios basales (Guízar 1994).

Otra característica de la HD es el exceso en la cantidad de dopamina. La presencia de una cantidad excesiva de dopamina es por lo menos una explicación parcial de los movimientos involuntarios (al contrario de la enfermedad de Parkinson, en la cual hay una disminución de la misma). Se ha postulado que los movimientos involuntarios en la HD representan una respuesta aumentada de los receptores estriatales a la dopamina (Burke 1996).

De esta manera se observan disminuciones o aumentos en los niveles de neurotransmisores, los que probablemente son secundarios a la degradación neuronal, y pueden contribuir a los síntomas de la HD (Guízar 1994).

Posibles mecanismos patogénicos o hipótesis de muerte neuronal:

Se han propuesto muchos mecanismos que producen neurodegeneración.

Interacciones con otras proteínas:

Estudios recientes sugieren que la longitud de poliQ modula varias funciones del producto génico y puede provocar que la HTT interactúe anormalmente con otras proteínas (Li 1999), tales interacciones podrían producir disfunción de los procesos celulares, activación de las vías de muerte celular y producción de radicales libres que den lugar a la pérdida neuronal.

La primera interacción fue reportada por Li *et al.* (1995), quienes encontraron la interacción del N-terminal de la HTT con una proteína de 70KDa llamada HAP1 (Proteína 1 asociada a la huntingtina), que se expresa predominantemente en el cerebro (corteza, estriado, cerebelo). Dos recientes estudios han mostrado que la HAP1 interactúa con dinactina P150^{Glued} (Engelender *et al.* 1997 y Li y Li 1998), lo cual sugiere su posible papel en el transporte intracelular. La HAP1 puede estar involucrada en el tráfico de organelas o proteínas como la HTT. La mutación puede alterar el transporte normal de la HTT vía HAP1 y llevar a la acumulación anormal y agregación en los procesos neuronales. Parece que la formación de agregados de proteínas insolubles precede a los síntomas neurológicos y a la neurodegeneración que ocurre en los estados tardíos. Además los agregados pueden interferir con el transporte (Li 1999).

También se ha visto que la HTT interactúa con la enzima GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase), quedando la enzima inactivada parcialmente. La GAPDH tiene un papel crítico en el metabolismo de la glucosa, que es prácticamente la única fuente de energía que reciben las células cerebrales. Además la GAPDH tiene funciones en la unión con los microtúbulos, reparación del ADN y la endocitosis (Jones *et al.* 1997, Hayden 2000).

La HTT también tiene una interacción indirecta con la calmodulina en presencia de calcio. La calmodulina es un intermediario en muchas vías de señalización mediadas por calcio. Muchos de los procesos celulares como el transporte o fusión de vesículas son dependientes de calcio, por lo que una alteración en la regulación de las proteínas que interactúan en este proceso puede tener consecuencias deletéreas (Myers *et al.* 1999b).

La HTT también tiene interacciones con la HIP2 (Proteína 2 que interacciona con la huntingtina) –que se expresa en altos niveles en el cerebro- del complejo

ubiquitina, que se relaciona con la renovación proteica de la célula (Jones *et al.* 1997, Hayden 2000).

Otra proteína que interactúa con la HTT es la enzima humana de conjugación de ubiquitina (hE2-25K), la cual se expresa ampliamente en el cerebro (Hayden 2000).

Todas estas proteínas se expresan en todo el cerebro y no presentan mayores niveles en las regiones más afectadas en la HD, sin embargo, podrían haber otras proteínas específicas en estas regiones que regulen la interacción entre la HTT y estas proteínas (Myers *et al.* 1999b).

Hipótesis de Fragmentos Tóxicos: activación de caspasas

La HTT es un sustrato conocido de las caspasas y los alelos con repeticiones CAG expandidas son más susceptibles al editaje por la caspasa 3, o sea, es influenciado por la longitud del tracto poliQ. ¿Cómo el editaje proteolítico se asocia con la pérdida neuronal selectiva?, no se sabe. Hay una hipótesis conocida como Hipótesis de fragmentos tóxicos, la cual postula que, la muerte neuronal selectiva podría darse debido a una vulnerabilidad selectiva de ciertas células a los efectos tóxicos de fragmentos truncados de HTT (particularmente cuando estos fragmentos contienen trozos o segmentos largos de poliglutamina), a través de mecanismos que todavía no son entendidos (Myers *et al.* 1999b, Hayden 2000). Ciertos estudios demuestran que los tramos de poliQ expandidos dentro de los fragmentos truncados (fragmentos N-terminal) son más tóxicos que los tramos expandidos embebidos en la proteína de longitud completa, por lo que se sugiere que el corte proteolítico es un paso en la iniciación de las enfermedades de poliQ (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

A menudo, tras el corte proteolítico hay una tendencia a formar inclusiones intraneuronales nucleares (IIN).

Alteraciones de la expresión génica

La HTT es una proteína fundamentalmente citosólica; sin embargo, la región N-terminal de la HTT mutante, y quizá también la proteína mutante de longitud completa, están presentes en el núcleo en algunas circunstancias. Una característica de la secuencia de la HTT es la presencia de un tramo largo de poliglutaminas seguido de un dominio de poliprolinas. Muchos factores y cofactores de transcripción (proteínas nucleares) contienen dominios ricos en glutaminas y prolinas, que pueden regular su actividad. Aunque la HTT no parece tener un dominio de unión al ADN, su estructura

N-terminal sugiere que interacciona con proteínas de regulación transcripcional (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Varios estudios han demostrado que la localización intranuclear de las formas truncadas N-terminal de la HTT mutante es necesaria para inducir degeneración en neuronas estriatales en cultivo. De hecho, cada vez hay más evidencias de que la HTT mutante es capaz de interrumpir las funciones normales dentro del núcleo. Concretamente, el fragmento N-terminal de la HTT se une al factor de transcripción TBP (TATA *binding protein*), y queda secuestrado dentro de los agregados de HTT mutante tanto en los cerebros de los pacientes con HD como *in vitro*. También se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que el fragmento N-terminal de la HTT mutante interactúa más eficientemente con CBP (CREB *binding protein*), un coactivador transcripcional y lo secuestra dentro de las IIN. El CBP es esencial para la sobrevivencia de las neuronas debido a su interacción con varios factores de transcripción (como CREB). Al quedar secuestrado, hay una disminución de CBP funcional en las células en cultivo y esto lleva a cambios en la expresión génica, como por ejemplo reducciones en la transcripción del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), en la toxicidad celular, así como a una reducción en la actividad acetiltransferasa (acetilación de histonas) (Martín-Aparicio y Lucas 2002 y Sugars y Rubinsztein 2003).

La región N-terminal de la HTT se puede unir también a la proteína proapoptótica p53 mediante secuencias SH3 PXXP (*Sarc-homology 3*) que se encuentran distales a sus tramos de poliQ y reprime la transcripción de los promotores que regula (Martín-Aparicio y Lucas 2002). Se ha encontrado que la región amino terminal de la HTT coagrega con p53 en inclusiones generadas en cultivos celulares e interactúa con p53 *in vitro* y en cultivos celulares. La región N-terminal de la HTT expandida reprime la transcripción de los promotores regulados por p53 (Steffan *et al.* 2000). La HTT mutante también interacciona *in vitro* a través de su dominio N-terminal y de modo dependiente de poliQ, con proteínas represoras de la transcripción como N-COR, lo que podría dar lugar a la expresión de genes normalmente inactivos. Además, la HTT se puede unir a otros factores de transcripción (HYP-B) y componentes del proceso de corte y empalme (HYP-A y -C) a través de sus poliprolinas de un modo dependiente de poliQ (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Hipótesis de Excitotoxicidad

Esta hipótesis propone que aminoácidos excitatorios producidos endógenamente en exceso o sustancias fisiológicamente involucradas en la neurotransmisión, dañan y matan las neuronas que son expuestas a sus efectos (Myers *et al.* 1999b).

El ácido glutámico o glutamato es un aminoácido y el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC del mamífero; el cuerpo estriado recibe una densa estimulación glutamatérgica de la corteza cerebral (Lipton y Rosenberg 1994).

Las neuronas que contienen glutamato constituyen una red extensa a lo largo de la corteza, hipocampo, estriado, tálamo, hipotálamo, cerebelo, y sistema visual/auditivo (Greenamyre y Porter 1994). Esta distribución sugiere que el glutamato es esencial en procesos como la cognición, memoria, movimiento, y sensación (gusto, vista, oído) (Lipton y Rosenberg 1994).

Las neuronas del estriado presentan receptores del glutamato en abundancia, principalmente los sensibles al N-metil-D-aspartato (NMDA). Es la activación de estos receptores lo que llevan a la despolarización y excitación de la neurona. El glutamato extracelular entra en contacto con el receptor NMDA junto con la glicina, activándolo ya sea en las dendritas o cuerpo de la neurona postsináptica. Esta activación se traduce en la apertura del canal del receptor, permitiendo la entrada de iones calcio (Ca^{+2}) en mayor grado y en menor grado iones sodio (Na^{+}), al mismo tiempo que salen iones potasio (K^{+}). El calcio, una vez en el interior de la célula, desencadena una serie de procesos (Lipton y Rosenberg 1994 y Doble 1999).

En un funcionamiento sináptico normal, la activación de receptores de aminoácidos excitatorios es transitoria. Sin embargo, en la HD se produce una hipersensibilidad de los receptores de tipo NMDA: la activación del receptor llega a ser excesiva o prolongada, las neuronas blanco se dañan, hay hiperactividad y la actividad excesiva lleva, en el futuro, a la degradación celular y la neurona muere (Doble 1999). Este proceso de muerte neuronal se llama excitotoxicidad y parece involucrar elevaciones sustanciales en los niveles de calcio intracelular. En otras palabras, los niveles normales de glutamato son saludables y necesarios para la función del cerebro, pero los niveles anormalmente altos pueden ser tóxicos para las neuronas y el glutamato se convierte entonces en una excitotoxina.

La entrada de calcio en la neurona desencadena una sucesión de eventos que libera radicales libres dentro de la neurona. Si un exceso de Ca^{2+} entra en la célula, entonces, la cantidad de radicales libres producida puede dañar o puede destruir la

neurona. Las neuronas pueden ser dañadas por glutamato sin llegar a morir. Muchas de las neuronas dañadas llegan a ser más vulnerables a una futura exposición al glutamato. El aumento de calcio activa una protein-kinasa que fosforila al receptor NMDA por lo que éste queda sensibilizado y responderá más intensamente la próxima vez que se libere glutamato en la sinapsis (Lipton y Rosenberg 1994).

El calcio puede participar en la muerte celular a través de mecanismos que implican la activación de la óxido nítrico sintasa, la fosfolipasa A₂ (PLA₂), proteasas y proteinquinasas. El aumento de la producción de óxido nítrico, que origina el potente radical peroxinitrito, contribuye a aumentar el estrés oxidativo (Fernandes 2001).

Bajo las condiciones ideales, el glutamato extracelular (en el espacio sináptico) es eliminado por las acciones protectoras de las células gliales, también conocidas como astrocitos. Los astrocitos recuperan el glutamato extracelular y lo convierten en glutamina. La glutamina atraviesa la membrana y llega a la neurona presináptica, donde es transformada en glutamato por la mitocondria. Este mecanismo de protección requiere grandes cantidades de energía en forma de ATP (Lipton y Rosenberg 1994). Por otra parte, las bombas iónicas dependientes de ATP de la membrana bombean el exceso de sodio y calcio hacia fuera de la neurona.

Si la producción de energía neuronal es baja, es decir, hay alteraciones en el metabolismo energético como sucede en la HD (por cualquier razón: hipoglicemia, oxígeno bajo, enzimas mitocondriales dañadas, etc), las bombas pueden, gradualmente fallar. Se produce el cierre de los canales y bombas iónicas dependientes de ATP, despolarizando la membrana y perjudicando la restauración del potencial de reposo. Esto puede conducir a que la neurona muera por sobreexcitación. El bloqueo de los receptores NMDA por Mg²⁺, dependiente del potencial de membrana, se vuelve ineficaz, de manera que incluso bajas concentraciones de glutamato se vuelven capaces de activar a sus receptores, aumentando la concentración intracelular de Ca²⁺ (Fernandes 2001).

De esta manera, la muerte celular puede ocurrir aún cuando las moléculas gliales (astrocitos) hayan tenido éxito quitando el glutamato extra presente en el espacio extracelular (Lipton y Rosenberg 1994).

En resumen: los daños en el metabolismo energético mitocondrial pueden llevar a un estado excitotóxico secundario debido a la apertura de los canales NMDA, por la interferencia con iones bombeados que actúan para mantener el potencial a través de las membranas neuronales. Debido a que se requiere de mucha energía para que las

membranas sinápticas se repolaricen completamente después de un estímulo despolarizante, los daños en la producción de ATP pueden llevar a una apertura prolongada de los canales de calcio voltaje-dependientes (Myers *et al.* 1999b).

Estrés oxidativo (radicales libres)

Un radical libre es una molécula o un átomo que presenta un electrón no apareado, razón por la cual son sumamente reactivos.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas generadas principalmente en la mitocondria durante el transporte de electrones en la cadena de fosforilación oxidativa, que, antes de convertir el oxígeno en agua originan los radicales superóxido (O_2^{\bullet}) e hidroxilo (OH^{\bullet}), además del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ligados a las enzimas de la cadena. Las ERO pueden generar reacciones en cadena con moléculas de todas las estructuras celulares, ya sean proteínas, lípidos de membrana, carbohidratos y ácidos nucleicos, provocando en ellas diversas alteraciones estructurales, que conducen a alteraciones de tipo funcional, y de esta manera la fisiología de las células y por consecuencia la de los organismos, se ve afectada. Es decir, se produce un desequilibrio en la célula al que se le llama estrés oxidativo. Debido a su localización en la matriz mitocondrial, a la falta de histonas y a sus mecanismos de reparación limitados, el ADN mitocondrial es el blanco principal del ataque de las ERO. En la HD se produce un aumento de las deleciones del ADN mitocondrial en las neuronas de los lóbulos temporal y frontal de la corteza, así como un aumento de la concentración de 8-hidroxi-deoxiguanosina, un marcador de la lesión oxidativa del ADN, en el caudado y en la corteza frontal.

El estrés oxidativo también contribuye en la excitotoxicidad del glutamato, ya que los radicales libres inhiben la captación del mismo por parte de las células de la glía, aumentando su concentración extracelular. Por lo tanto, la neurotoxicidad inducida por glutamato está íntimamente relacionada con el estrés oxidativo (Fernandes 2001).

Alteraciones del metabolismo energético y de la función mitocondrial:

En el cerebro de personas con la HD, las actividades enzimáticas de diversas proteínas mitocondriales que participan en la fosforilación oxidativa están disminuidas. En concreto las actividades de los complejos II, III y IV se reducen en el estriado con la HD (Martín-Aparicio y Lucas 2002). En la HD se produce un déficit del 55% en la actividad de los complejos mitocondriales II y III y de un 25% del complejo IV, en el

caudado y el putamen. Los déficit del complejo II se caracterizan por la disminución de la oxidación de los sustratos dependientes del FADH_2 , como el succinato, y en la oxidación normal de los dependientes del NADH, como el malato, mientras que el bloqueo del complejo III altera la oxidación de ambos. Pero cualquier déficit enzimático que afecta a la cadena respiratoria, independientemente de su localización, atañe de manera importante el metabolismo celular, limitando el ciclo del ácido cítrico y la oxidación del piruvato, que en lugar de convertirse en Acetil CoA, pasa a ser metabolizado a lactato y así se reduce la cantidad de moléculas de ATP producidas (Fernandes 2001).

Diferentes estudios han mostrado que en la HD tiene lugar una disminución de la perfusión sanguínea cerebral, detectada incluso en portadores presintomáticos de la mutación. Al disminuir la perfusión sanguínea, el metabolismo aeróbico de la glucosa se ve alterado, que es la manera casi exclusiva a través de la cual las neuronas obtienen la energía (Fernandes 2001).

El metabolismo mitocondrial no es solo la fuente más importante de intermediarios de alta energía, sino también de radicales libres. Los defectos mitocondriales podrían tener un efecto causal en la neurodegeneración como consecuencia del déficit de energía y/o por el daño oxidativo. La disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial se asocia con anomalías en el ADN mitocondrial y con mutaciones en genes nucleares directamente involucrados en las funciones mitocondriales (Myers *et al.* 1999b).

El ADN mitocondrial es extremadamente sensible al daño mutagénico, no solo porque está en contacto con la producción de radicales libres, sino también porque el ADN mitocondrial pierde las histonas protectoras y muchos mecanismos de reparación. Muchos estudios indican que los ganglios basales y la corteza cerebral tienen altos niveles de utilización de glucosa, mientras que, el cerebelo tiene las tasas metabólicas más bajas, por lo que la disfunción mitocondrial puede ser particularmente relevante en enfermedades neurodegenerativas. (Myers *et al.* 1999b).

Algunos procesos descritos anteriormente requieren energía. Si una gran cantidad de glutamato es liberada dentro del espacio extracelular, los astrocitos requerirán una gran cantidad de energía para proteger a las neuronas del exceso de glutamato. De la misma forma, si los astrocitos fallan en remover el exceso de glutamato en el tiempo adecuado, entonces las neuronas se verán forzadas a gastar

grandes cantidades de energía tratando de controlar el exceso de excitación causado por el exceso de glutamato (Lipton y Rosenberg 1994).

Todos los eventos descritos anteriormente, los cuales ocurren en la ausencia de neurodegeneración, pueden estar relacionados y es probable que varios estén ocurriendo en las personas con la HD. Aunque es evidente que la expansión poliQ de la huntingtina confiere la propiedad patogénica, la vía que lleva a la neurodegeneración permanece sin ser dilucidada (Jones *et al.* 1997 y Li 1999).

La situación en Costa Rica

A pesar de ser la HD una terrible enfermedad que demanda nuestra atención, no ha sido estudiada en Costa Rica ni se conoce su prevalencia. Este proyecto representa un esfuerzo para establecer por primera vez en Costa Rica el diagnóstico molecular para la HD e iniciar su investigación en el país. Por ser una enfermedad neurodegenerativa, progresiva y totalmente discapacitante, es importante conocer la población costarricense que porta la mutación, e implementar los métodos diagnósticos moleculares, ya que esto es requisito indispensable para ofrecer el consejo genético adecuado y oportuno. En última instancia, esto favorecerá un mejor manejo clínico de los pacientes, y por lo tanto, podrá ser traducido en un incremento considerable de la calidad de vida de las familias con la HD.

Objetivo general

Determinar el tamaño exacto de la mutación en los pacientes afectados por la HD y sus familiares mediante el uso de la biología molecular, con el fin de conocer cómo se está expresando la mutación en las familias costarricenses y así poder ofrecer el consejo genético adecuado y oportuno.

Objetivos específicos

1. Implementar el diagnóstico molecular de la HD en Costa Rica utilizando técnicas de biología molecular.
2. Localizar familias donde existan pacientes afectados por la HD (con trastornos del movimiento, cognitivos y/o emocionales que podrían corresponder con la HD) y realizar una entrevista sobre la necesidad e interés de contar con los beneficios que ofrece el diagnóstico molecular.
3. Construir la genealogía de cada familia, con miras a la identificación de los individuos afectados y portadores en la familia.
4. Confirmar el diagnóstico clínico de la HD en pacientes afectados y realizar el diagnóstico presintomático a los familiares en riesgo, mediante la utilización del diagnóstico directo de la mutación que causa la HD, por procedimientos moleculares.
5. Estudiar el comportamiento e inestabilidad intergeneracional de la repetición, para establecer diferencias entre los sexos que están transmitiendo la expansión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto contó con la aprobación del Comité Etico Científico de la Universidad de Costa Rica (VI-DGI-6163-F-356-03), así como también del Hospital Nacional Psiquiátrico (CEC 038-2003).

Población de estudio:

En total se estudiaron 38 individuos pertenecientes a 4 familias costarricenses, incluyendo pacientes con diagnóstico clínico de HD como sus familiares en riesgo. Los casos índices fueron localizados en el Hospital Calderón Guardia de Costa Rica y consultorios particulares de neurólogos y mediante la revisión de expedientes en el Hospital Nacional Psiquiátrico de Costa Rica también fue posible localizar a otras familias.

Visitas a las familias:

Una vez que se obtuvo la lista de casos de pacientes diagnosticados con la HD, se procedió a ubicar a las familias vía telefónica. Posteriormente se visitaron sus casas de habitación para invitar a los pacientes y sus familiares a participar en el estudio. Todas las familias recibieron información previa al análisis genético, con respecto a las características clínicas y a la naturaleza del consejo genético. A cada familia se le explicó con detalle las características de la enfermedad y en qué consistía el proyecto. También se les informó sobre el patrón de herencia y el significado del estudio genético y finalmente se les consultó sobre la necesidad e interés de contar con los beneficios que ofrece el diagnóstico molecular de la HD: tanto el diagnóstico confirmatorio (para pacientes con diagnóstico clínico de la HD), como el diagnóstico presintomático (para individuos asintomáticos con el 50% de riesgo de padecer la HD). Este es un método que determina si una persona es portadora o no de la mutación en el gen de la HD, antes de que aparezcan los síntomas.

Las personas que accedieron a participar en el estudio firmaron la fórmula de consentimiento informado (Apéndice I), previamente aprobada por los Comités Éticos mencionados anteriormente. Una vez firmada se les tomó una muestra de sangre para extracción del ADN. Además se entrevistó al menos a un miembro de cada familia, y con la información se llenó un formulario (Apéndice I) diseñado con el fin de obtener los antecedentes familiares. Posteriormente se procedió a la elaboración de las genealogías de cada familia con el programa PED42.

Dadas las consecuencias psicológicas y emocionales que conlleva saber si se es portador o no de la mutación en el gen de la HD, ya que se pueden afectar varios aspectos de la vida, no solo el bienestar personal, sino la relación con la familia, los amigos, el trabajo y los estudios; este proyecto cuenta con un equipo multidisciplinario, donde además de biólogos genetistas encargados del diagnóstico molecular y de neurólogos, se cuenta con psicólogos de la salud de la Escuela de Psicología y del Instituto de Investigaciones Psicológicas de la Universidad de Costa Rica. Los psicólogos llevan a cabo la evaluación y asesoría psicológica a los pacientes del estudio y sus familiares. Se pretende que los pacientes y sus familiares, en especial aquellos que reciban un resultado positivo, (una prueba genética positiva significa que la probabilidad de padecer la enfermedad es casi del 100% aunque el momento de la manifestación de los primeros síntomas no se pueda predecir), tengan la oportunidad y se les garantice el debido asesoramiento genético y apoyo psicológico continuo, tanto durante el proceso de decidir si quieren o no ser estudiados como posteriormente. Para esto, se administró una batería de pruebas psicológicas a quienes aceptaron participar en el estudio. Se administraron pruebas psicológicas en cuatro distintos momentos del estudio: a) antes de brindar el diagnóstico molecular (línea base), durante la cual se realizó una entrevista psicológica a profundidad. Para aquellos que salen positivos, b) una semana posterior a la comunicación del diagnóstico, c) 6 meses después, d) un año después de brindado el diagnóstico. La batería completa de pruebas se administra en una sesión en cada uno de los cuatro distintos momentos de evaluación.

Recolección de las muestras:

A cada participante del estudio se le tomó una muestra de sangre (entre 8 y 10 ml) en tubos Vacutainer estériles con anticoagulante ACD. Las muestras fueron

llevadas al laboratorio en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica, en donde se procedió a hacer la extracción del ADN por los métodos usuales (Strauss 1988) (Apéndice II) y a desarrollar el protocolo molecular para el diagnóstico directo de la mutación. Para recolectar el mayor número de muestras posibles, además de las visitas a las familias en las casas de habitación, también se tomaron muestras en el INISA, consultorios privados y el Hospital Calderón Guardia.

Diagnóstico Molecular:

Para determinar el número de las repeticiones CAG, tanto en los individuos afectados como en los asintomáticos, se siguieron las normas internacionales (Anónimo 1998) según las cuales se realiza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es un método que se utiliza para amplificar un segmento de ADN *in vitro* en el que se requieren dos iniciadores adyacentes a los segmentos a amplificar y una enzima que sintetice el segmento deseado.

En primer lugar, el ADN fue extraído de leucocitos de sangre periférica mediante una extracción con fenol-cloroformo según los procedimientos usuales (Strauss 1988) (Apéndice II).

Una vez extraído el ADN mediante fenol-cloroformo, éste se cuantificó en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm, con el fin de conocer la concentración de la muestra. Una vez cuantificado las muestras se almacenaron a 4°C.

El protocolo de la PCR usado para la determinación del número de repeticiones CAG fue el descrito por Warner *et al.* (1993), con algunas modificaciones. La PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 µl. Se amplificaron 150 ng de ADN genómico usando: buffer 10X (10mM Tris-HCl pH:8.8, 50mM KCl, 0.8% Nonidet P40), DMSO (dimeltisulfóxido) al 10%, 1.5mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 2U de Taq polimerasa (Fermentas), agua destilada y 0.5 µM de cada uno de los iniciadores HD1 (5'-ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TTC-3') y HD3 (5'-GGC GGT GGC GGC TGT TGC TGC TGC TGC TGC TGC-3'), que amplifican selectivamente las repeticiones CAG.

El perfil de reacción utilizado en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400), fue el siguiente: una desnaturalización inicial del ADN por 4 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 45 segundos de extensión a 72°C. Finalmente un período de extensión final a 72°C por 10 minutos. Las muestras se almacenaron a 4°C.

Posteriormente los productos de la PCR se corrieron en minigeles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, en buffer TBE 1X pH: 7.7 durante 1 hora con el fin de confirmar si había producto amplificado y determinar inicialmente, según el tamaño relativo de los fragmentos amplificados, la presencia o ausencia de la mutación (Fig.3).

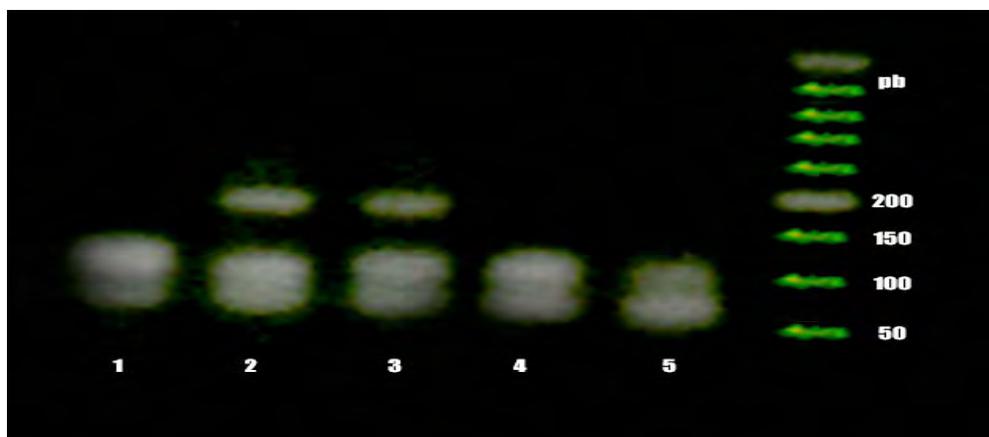


Figura 3. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio

En los carriles 2 y 3 se observan amplificaciones de la tripleta CAG en muestras de pacientes afectados con la HD. En los carriles 1,4 y 5 amplificaciones de la tripleta CAG en personas no afectadas. A la derecha, se observa el marcador de peso molecular con los tamaños de las bandas en pares de bases (pb).

Finalmente, los productos de la PCR se sometieron a una electroforesis sobre geles de poliacrilamida desnaturalizante al 6% o al 8% (Apéndice II), en buffer TBE 1X pH: 8.0 por un período de 2h 50min, para determinar el tamaño absoluto de los fragmentos (Fig.4). Estos geles permiten una alta sensibilidad de detección y discriminación entre normales y afectados. Los fragmentos fueron visualizados mediante el método de tinción con nitrato plata. (Apéndice II)

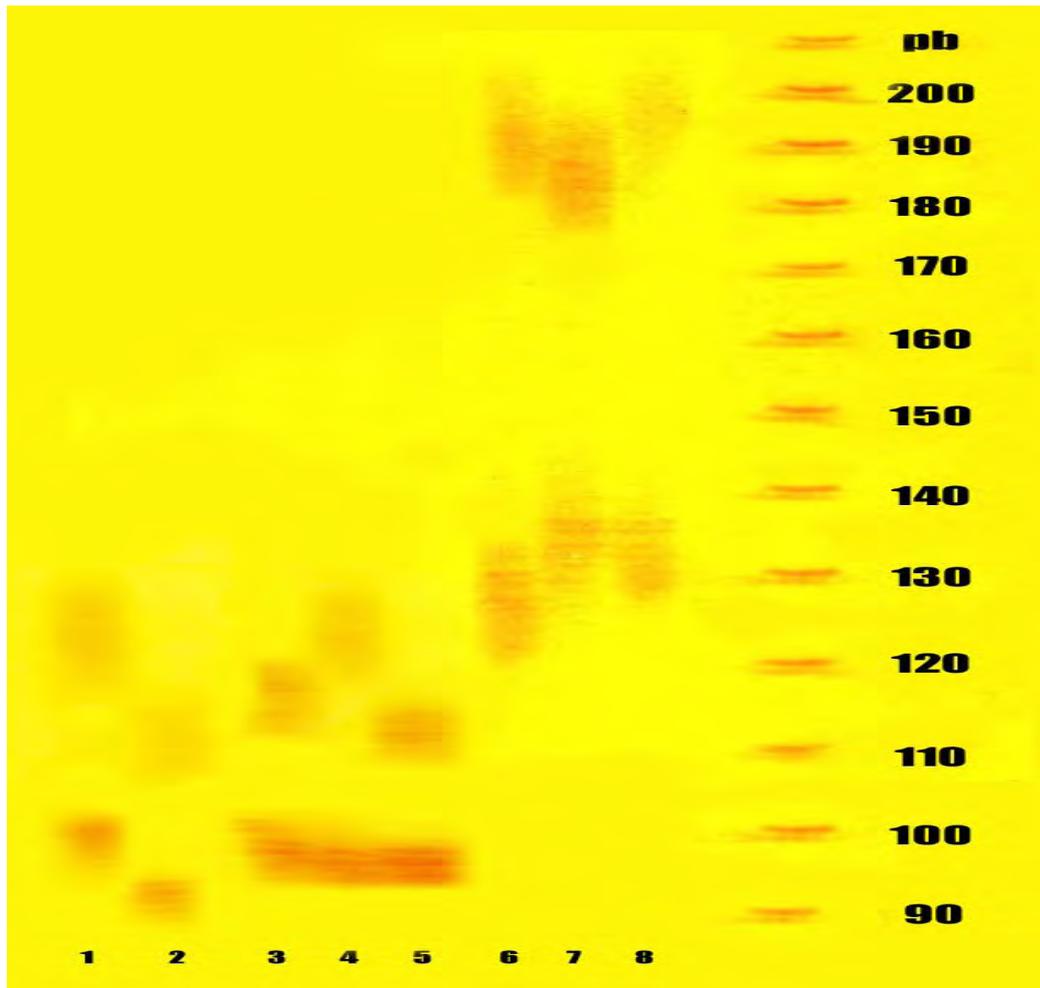


Figura 4. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% teñido con nitrato de plata

En los carriles 1 a 5 se observan alelos con repeticiones de tamaños normales: (1)17/26, (2)15/21, (3)17/24, (4)16/26 y (5)16/21. Los carriles 6 a 8 corresponden a amplificaciones de la triplete CAG en muestras de pacientes afectados con la HD, cuyos tamaños son: (6)26/48, (7)28/46 y (8)28/49. A la derecha, el marcador de peso molecular con los tamaños de las bandas en pares bases (pb)

El tamaño de los fragmentos se determinó por la comparación con marcadores moleculares de tamaño definido. La mutación se diagnostica cuando los fragmentos amplificados presentan más de 40 repeticiones (167pb). Las personas que presentan tamaños entre las 36 y 39 repeticiones, algunos desarrollarán la enfermedad y otros no y sus hijos tienen riesgo de heredar fragmentos de más de 40 repeticiones y por lo tanto desarrollar la enfermedad.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se realizaron varias pruebas. Para establecer la correlación entre el tamaño de la mutación y la edad de inicio, se utilizó el coeficiente de correlación r de Pearson (nivel de significancia al 1%). Para determinar si hay diferencias en cuanto al sexo afectado y en cuanto a la preferencia en la transmisión del alelo HD según el sexo del progenitor afectado se realizaron pruebas de Chi-cuadrado (nivel de significancia al 5%). Para determinar si existen diferencias en el tamaño de los alelos expandidos según el sexo afectado y la transmisión (materna o paterna) se realizó la prueba U de Mann-Whitney (nivel de significancia al 5%).

RESULTADOS

Las visitas a las familias afectadas se iniciaron en setiembre del 2003. Hasta la fecha se han identificado las primeras 8 familias costarricenses en las cuales segrega el gen de la HD. Las personas que participaron en este estudio pertenecen a 4 de estas familias y viven en Colima de Tibás, San Rafael Abajo de Desamparados, Zapote, Limón, Rincón Grande de Pavas, Los Guidos de Desamparados, Hatillo 8 y Paso Canoas. En cada una de ellas existe al menos un individuo con un diagnóstico clínico de la HD.

Todos los 38 individuos que accedieron a participar en el estudio, dieron voluntariamente una muestra de sangre, después de firmar la fórmula de consentimiento informado. La mayoría de los participantes manifestaron su interés por contar con los beneficios que ofrece el diagnóstico molecular de la HD y por lo tanto conocer el resultado, a excepción de un individuo que dijo no querer saber el resultado del análisis y cuatro personas que dijeron no estar totalmente seguras de querer conocer los resultados del diagnóstico molecular al menos en ese momento. Sin embargo, todos estuvieron de acuerdo en que se les realizara el diagnóstico molecular.

A estas familias se les construyó el árbol genealógico con ayuda del programa PED42 y se les tomó las muestras de sangre para los análisis moleculares. En total se recogieron y analizaron 38 muestras de sangre, de las cuales 21 (55.3 %) correspondían a mujeres y 17 (44.7%) a varones. La edad promedio de los sujetos del estudio fue de 34.1 años (DE \pm 15.2).

De estos 38 individuos, 7 presentaban síntomas en el momento de ser invitados a formar parte del estudio (5 tenían un diagnóstico clínico de HD y mostraban los síntomas característicos, mientras que las otras 2 personas mostraban síntomas iniciales -movimientos coreicos leves-, pero no tenían un diagnóstico clínico). Las restantes 31 personas correspondían a familiares en riesgo. A todos los individuos se les realizó el diagnóstico molecular. La mutación de la HD se logró detectar en las 4 diferentes familias.

Familia 1:

En la Familia #1 (Fig.5) el estudio molecular se realizó a 13 individuos. En esta familia se detectó que ambos sexos están transmitiendo la enfermedad.

Dos de los individuos (III.2 y III.7) estaban clínicamente afectados, o sea, mostraban signos y síntomas de la HD. En estos 2 pacientes se logró confirmar el diagnóstico clínico mediante el diagnóstico molecular de la mutación que causa la HD (positivos afectados): el individuo III.2 portaba una amplificación de 46 repeticiones (murió durante el período del estudio) y el III.7 presenta una amplificación con 47 repeticiones.

A los restantes 11 individuos, todos asintomáticos en el momento del estudio, se les realizó el diagnóstico presintomático y se logró detectar la mutación en 5 de ellos (positivos asintomáticos), lo cual significa que son portadores de la mutación que causa la HD y por lo tanto, en algún momento de su vida desarrollarán síntomas y tienen riesgo de heredarla a sus hijos. Mediante la PCR se logró determinar que el individuo IV.1 heredó de su madre un alelo con 46 repeticiones, la paciente IV.2 recibió un alelo con 49 repeticiones de su madre y su hermana, (IV.3) heredó una amplificación de 46 repeticiones. La paciente III.7 con 47 repeticiones le heredó a su hija, la paciente IV.9, un alelo con 43 repeticiones, presentándose una contracción intergeneracional de 4 repeticiones. Y por último, el individuo IV.5 heredó de su padre (III.4), quien es hermano del individuo III.7 una mutación con 50 repeticiones.

En los 6 restantes, (II.8, II.11, III.11, III.22, IV.7 y IV.8) la PCR dio como resultado fragmentos normales, lo que significa que no son portadores de la mutación que causa la HD (sanos), por lo tanto, no desarrollarán la enfermedad y no tienen riesgo de heredarla a sus hijos.

En total, de los 13 individuos analizados en esta familia, a 7 se les detectó la mutación HD mediante PCR (positivos) (Fig.5).

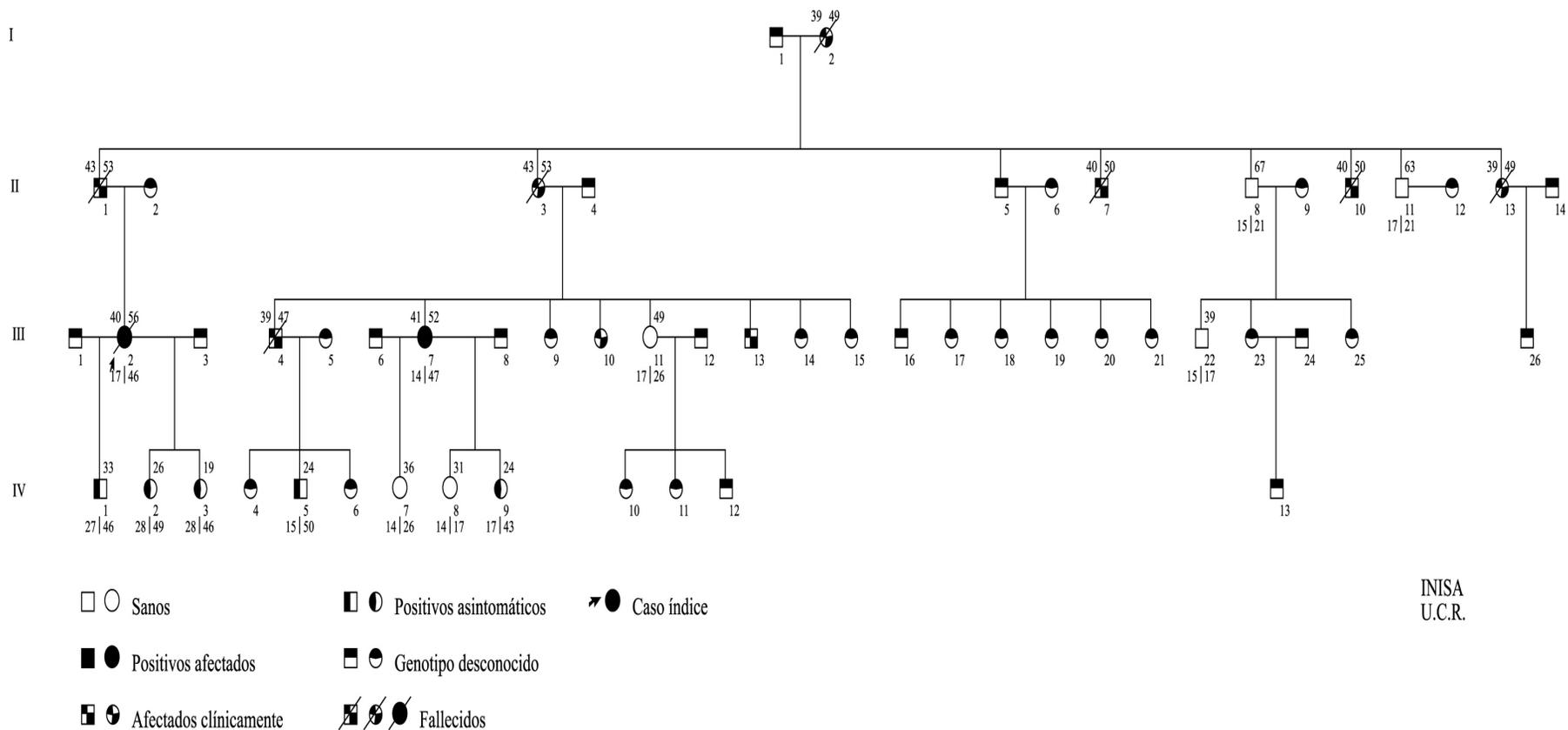


Figura 5. Genealogía de la familia #1. Para los casos estudiados, debajo del símbolo se muestra el número de repeticiones obtenido mediante PCR. El número colocado en la parte superior izquierda representa la edad de inicio de la HD y el número en la parte superior derecha representa la edad de muerte o edad actual, según el caso.

Familia 2:

En la Familia #2 (Fig.6) se logró estudiar 12 individuos. En esta familia, por el momento, el sexo que está transmitiendo la enfermedad es el masculino.

De todos los individuos estudiados, dos de ellos (II.10 y II.14) presentaban ya signos y síntomas de la enfermedad con diferente grado de severidad, pero solo el individuo II.10 tenía un diagnóstico clínico de HD mientras que el otro, II.14, estaba manifestando los primeros signos, pero no tenía todavía diagnóstico clínico. Los resultados de los estudios moleculares confirmaron el diagnóstico clínico del individuo II.10 y demostraron que portaba una amplificación de 50 repeticiones (murió durante el período del estudio). Además confirmaron las sospechas de padecer la HD del paciente II.14, quien presenta una amplificación con 48 repeticiones, por lo tanto ambos son positivos afectados.

El diagnóstico presintomático en los restantes 10 miembros de esta familia arrojó los siguientes resultados: el individuo II.10 con una amplificación de 50 repeticiones, le transmitió la mutación a su hija (III.12) quien porta una amplificación de 55 repeticiones, la mutación más grande de todos los casos estudiados hasta el momento en Costa Rica, esto representa una amplificación intergeneracional de 5 repeticiones y en conclusión significa que es portadora de la mutación que causa la HD y por lo tanto, desarrollará la enfermedad (positiva asintomática) y tiene riesgo de heredarla a sus hijos. En los 9 individuos restantes, (II.3, II.5, II.9, II.15, III.9, III.10, III.11, III.13 y III.14) los análisis moleculares dieron como resultado alelos de tamaños normales, lo que significa que son sanos, podrán desarrollar una vida normal y fundar una familia sin el riesgo de tener hijos afectados.

En total, de los 12 individuos analizados en esta familia, a 3 se les detectó la mutación HD mediante PCR (positivos) (Fig.6).

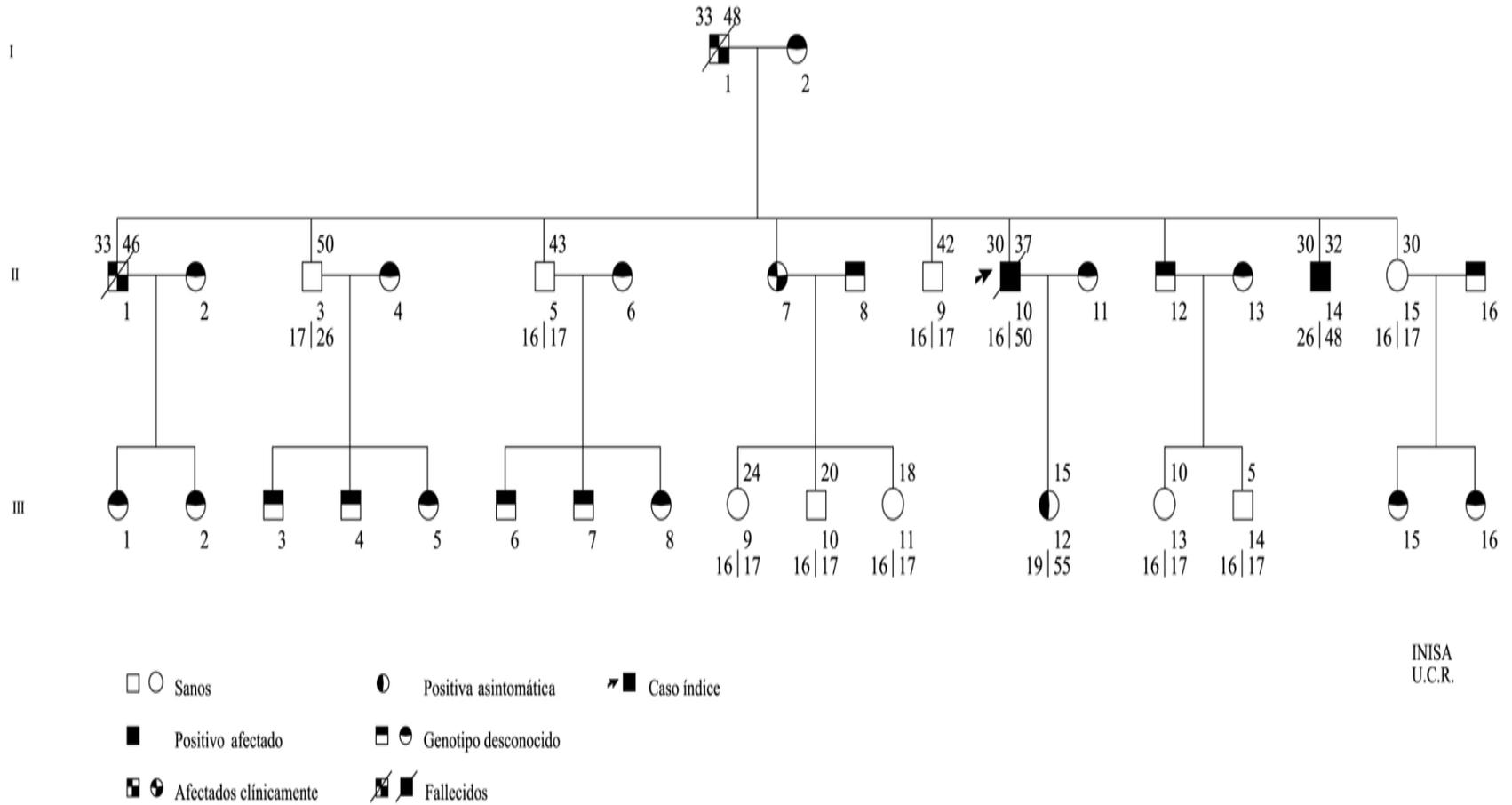


Figura 6. Genealogía de la familia #2. Para los casos estudiados, debajo del símbolo se muestra el número de repeticiones obtenido mediante PCR. El número colocado en la parte superior izquierda representa la edad de inicio de la HD y el número en la parte superior derecha representa la edad de muerte o edad actual, según el caso.

Familia 3:

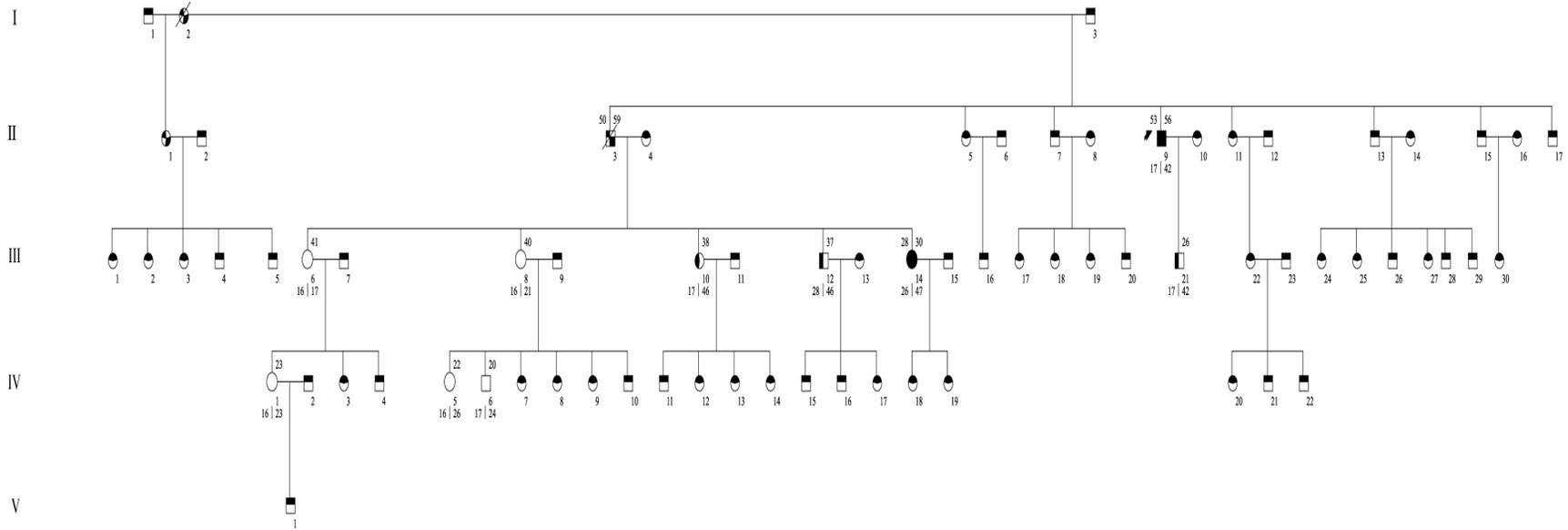
En la Familia #3 (Fig.7) se logró estudiar a 10 individuos. En esta familia ambos sexos están transmitiendo la enfermedad.

Uno de los sujetos estudiados (II.9) tenía el diagnóstico clínico de la HD. El resultado del diagnóstico molecular mediante la PCR confirmó este diagnóstico, al mostrar que el paciente porta una amplificación de 42 repeticiones de la tripleta CAG (positivo afectado). Otro de los individuos, el III.14, estaba manifestando los primeros signos, pero no tenía todavía diagnóstico clínico. Los resultados de los estudios moleculares demostraron que porta una amplificación de 47 repeticiones (positivo afectado).

El diagnóstico presintomático en los restantes 8 miembros de esta familia dio como resultado que 3 de los individuos presentan una amplificación de la tripleta CAG. Mediante la PCR se logró determinar que el individuo II.9 (positivo afectado), transmitió la mutación a su hijo (III.21), quien presenta 42 repeticiones. La paciente III.10 y el individuo III.12 heredaron una amplificación de 46 repeticiones. Ninguno de estos individuos presenta síntomas de la enfermedad hasta el momento (positivos asintomáticos).

Los 5 individuos restantes, (III.6, III.8, IV.1, IV.5 y IV.6) presentan fragmentos dentro de un intervalo normal de repeticiones, por lo que son sanos, no desarrollarán la enfermedad ni tampoco tienen riesgo de heredarla.

En total, de los 10 individuos analizados en esta familia, a 5 se les detectó la mutación HD mediante PCR (positivos) (Fig.7).



- ○ Sanos
- ◐ ◑ Positivos asintomáticos
- ◑ ◐ Positivos afectados
- ◑ ◑ Afectados clínicamente
- ◐ ◑ Genotipo desconocido
- ◑ ◑ Fallecidos
- ◑ ◑ Caso índice

INISA
U.C.R.

Figura 7. Genealogía de la familia #3. Para los casos estudiados, debajo del símbolo se muestra el número de repeticiones obtenido mediante PCR. El número colocado en la parte superior izquierda representa la edad de inicio de la HD y el número en la parte superior derecha representa la edad de muerte o edad actual, según el caso.

Familia 4:

En la Familia #4 (Fig.8) el estudio molecular se realizó a 3 individuos. En esta familia ambos sexos están transmitiendo la enfermedad.

El paciente II.1 estaba clínicamente afectado, o sea, mostraban síntomas de HD. El diagnóstico molecular nos permitió confirmar el diagnóstico clínico, al encontrar que era portador de una amplificación de 42 repeticiones (positivo afectado).

El diagnóstico presintomático en los otros 2 miembros de esta familia arrojó los siguientes resultados: la paciente III.1 heredó de su padre (II.1) un alelo con 47 repeticiones, esto representa una amplificación intergeneracional de 5 repeticiones y ésta le transmitió la mutación a su hija (IV.1), quien porta una amplificación de 43 repeticiones, aquí se presenta por el contrario contracción intergeneracional de 4 repeticiones. En conclusión significa que ambas son positivas asintomáticas, o sea, portadoras de la mutación que causa la HD y por lo tanto, desarrollarán dicha enfermedad y tienen riesgo de heredarla a sus hijos.

En total, a los 3 individuos analizados en esta familia se les detectó la mutación HD mediante PCR (positivos) (Fig.8).

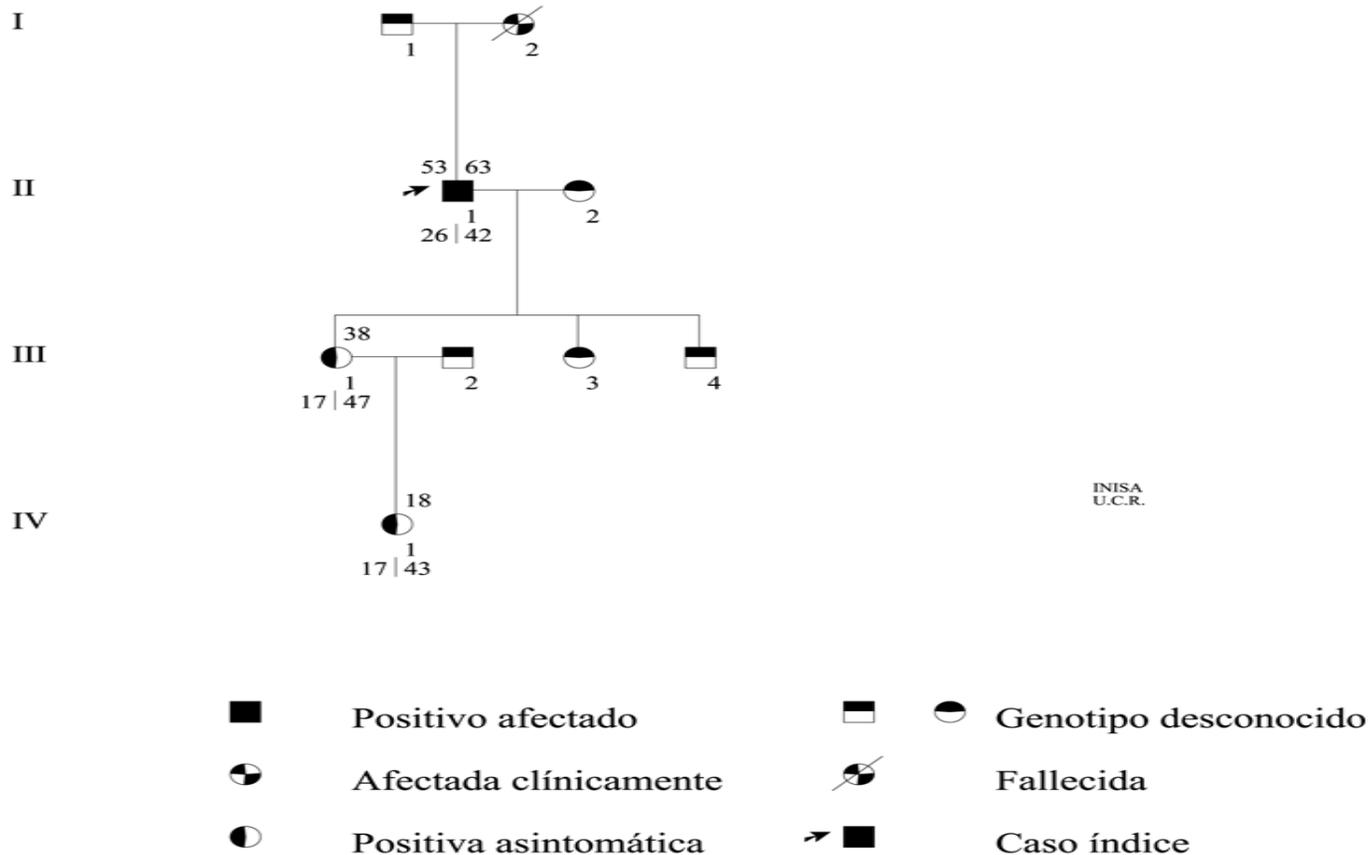


Figura 8. Genealogía de la familia #4. Para los casos estudiados, debajo del símbolo se muestra el número de repeticiones obtenido mediante PCR. El número colocado en la parte superior izquierda representa la edad de inicio de la HD y el número en la parte superior derecha representa la edad de muerte o edad actual, según el caso.

En general:

Las expansiones (mutaciones) fueron observadas en un total de 18 individuos. Las características moleculares de estos 18 individuos positivos para la mutación, se pueden observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Características moleculares de 18 individuos costarricenses con la mutación HD

Individuo	Familia	Sexo	Transmisión	Edad de inicio (años)	N° Rep CAG alelo normal	N° Rep CAG alelo expandido
III.2	1	F	Paterna	40	17	46
III.7	1	F	Materna	41	14	47
IV.1	1	M	Materna	Asintomático	27	46
IV.2	1	F	Materna	Asintomática	28	49
IV.3	1	F	Materna	Asintomática	28	46
IV.5	1	M	Paterna	Asintomático	15	50
IV.9	1	F	Materna	Asintomática	17	43
II.10	2	M	Paterna	30	16	50
II.14	2	M	Paterna	30	26	48
III.12	2	F	Paterna	Asintomática	19	55
II.9	3	M	Materna	53	17	42
III.10	3	F	Paterna	Asintomática	18	46
III.12	3	M	Paterna	Asintomático	28	46
III.14	3	F	Paterna	28	26	47
III.21	3	M	Paterna	Asintomático	17	42
II.1	4	M	Materna	53	26	42
III.1	4	F	Paterna	Asintomática	17	47
IV.1	4	F	Materna	Asintomática	17	43

De 18 individuos con la mutación (positivos), 8 eran hombres y 10 mujeres, (Cuadro 3) lo que corresponde a un 44.4% y 55.6% respectivamente. Vemos entonces que no hay diferencias significativas en cuanto al sexo afectado ($X^2 = 0.22$, $P=0.05$, $gl=1$).

De estas 18 personas con la mutación, 7 mostraban ya signos y síntomas de la HD mientras que las restantes 11 personas en las que se encontró la mutación (7 de

ellas con edades menores a los 30 años), no presentaban síntomas (positivas asintomáticas) (Cuadro 3). Por lo tanto, encontramos que el 35.5% de los individuos en riesgo (11/31) eran portadores de la mutación. La relación entre individuos afectados (n=7) y asintomáticos (n=11) es 1:1.6.

El estudio molecular permitió cuantificar el número de repeticiones de la tripleta CAG en el gen de la HD. Todos los 18 pacientes en los que se encontró la mutación, resultaron ser heterocigotas, con un alelo normal y un alelo expandido (Cuadro 3). El número de repeticiones CAG en los alelos mutados (expandidos) varió de 42 a 55, con un promedio de 46.4 repeticiones CAG ($DE \pm 3.4$) siendo el alelo más común de 46 repeticiones (27.8%) (Fig. 9)(Cuadro 3).

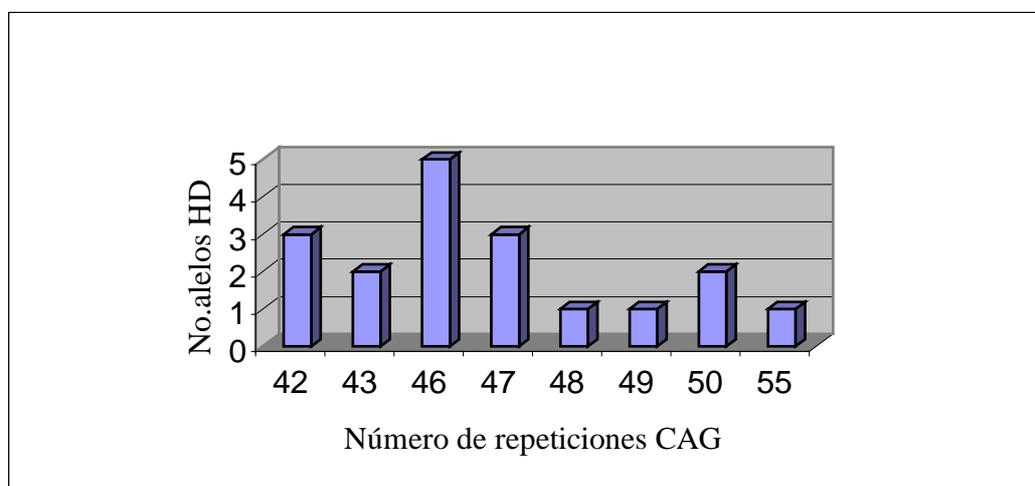


Figura 9. Distribución de repeticiones CAG en alelos mutados de individuos afectados con la HD

No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los alelos expandidos entre hombres afectados (promedio= 45.75 CAGs) y mujeres afectadas (promedio=46.9 CAGs) (U Mann Whitney, $P > 0.05$).

Se encontró además que 10 de los alelos expandidos fueron transmitidos vía paterna y 8 de los alelos expandidos fueron transmitidos vía materna (Cuadro 3), de esta manera vemos que no hay diferencias significativas en la transmisión del alelo expandido, según el sexo del progenitor transmisor ($X^2 = 0.22$, $P = 0.05$, $gl = 1$). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las repeticiones CAG expandidas entre pacientes en los que la transmisión fue paterna (promedio=47.7 CAGs) y aquellos con transmisión materna (promedio=44.7 CAGs) (U Mann Whitney,

$P > 0.05$). No se encontraron alelos intermedios entre 36 y 39 repeticiones en la población en estudio.

Tomando en cuenta los alelos normales (no expandidos) en los individuos en los que se detectó la mutación ($n=18$), éstos presentaron entre 14 y 28 repeticiones, con un promedio de 20.7 repeticiones CAG ($DE \pm 5.3$) y un alelo modal de 17 repeticiones (38.9%) (Cuadro 3) (Fig. 10).

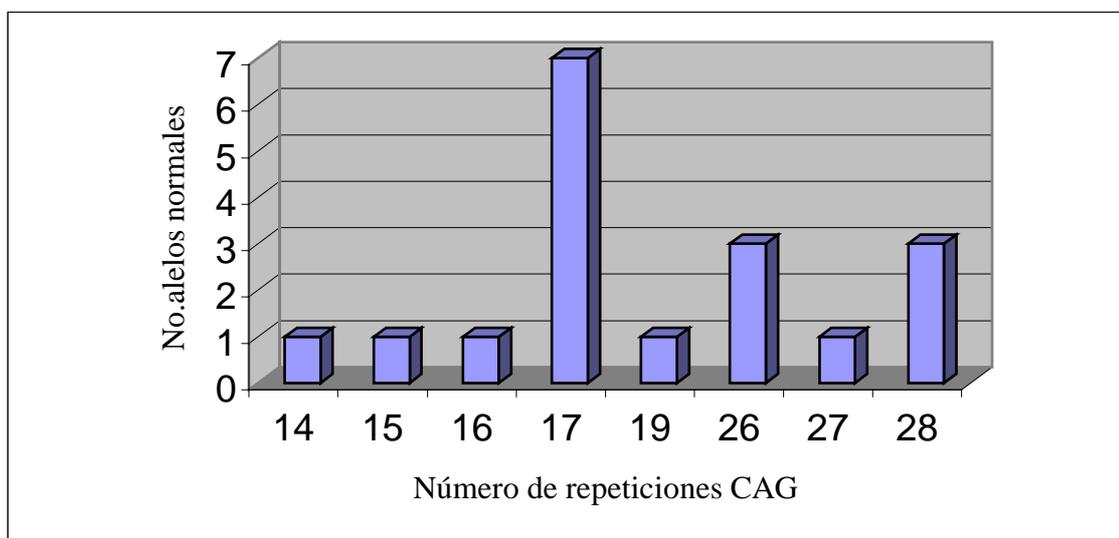


Figura 10. Distribución de repeticiones CAG en alelos normales de individuos afectados con la HD

En las 4 familias se observó inestabilidad de la repetición CAG durante la transmisión de una generación a la siguiente, tanto a través de la vía materna como paterna. La mutación fue inestable en el 62.5% (5/8) de las transmisiones intergeneracionales para las que se tienen los datos, mostrando tanto incrementos como disminuciones en el número de repeticiones CAG. En las restantes 3 parejas progenitor-hijo(a) no se observaron cambios en el número de repeticiones CAG (Cuadro 4).

Cuadro 4. Relación del tamaño de la mutación entre progenitores e hijos(as) en 4 familias costarricenses donde segrega el gen de la HD

Familia	Progenitor (Tamaño de la mutación)	Hijo (a) (Tamaño de la mutación)	Cambio intergeneracional (N° CAG)	Transmisión
1	III.2 (46 CAG)	IV.1 (46CAG)	0	Materna
1	III.2 (46 CAG)	IV.2 (49 CAG)	+3	Materna
1	III.2 (46 CAG)	IV.3 (46 CAG)	0	Materna
1	III.7 (47 CAG)	IV.9 (43 CAG)	-4	Materna
2	II.10 (50 CAG)	III.12 (55 CAG)	+5	Paterna
3	II.9 (42 CAG)	III.21 (42 CAG)	0	Paterna
4	II.1 (42 CAG)	III.1 (47 CAG)	+5	Paterna
4	III.1 (47 CAG)	IV.1 (43 CAG)	-4	Materna

Cuando se compara el tamaño de la mutación en los progenitores y en los hijos (as), se observa que en los casos en los que la transmisión es vía materna, con la excepción de uno, se transmite un alelo de igual o menor tamaño (contracciones en el número de repeticiones), mientras que por el contrario, cuando la transmisión es paterna, el alelo con la mutación en el hijo(a) es de mayor tamaño que el alelo con la mutación en el padre, excepto en un caso donde se hereda un alelo con el mismo número de repeticiones. Es importante destacar que en el individuo con 55 repeticiones, o sea, la mayor expansión de la tripleta CAG encontrada, la transmisión fue por vía paterna.

Como ya se mencionó anteriormente, de las 18 personas a las que se les detectó la mutación HD, 11 permanecían asintomáticas mientras que las restantes 7 mostraban los síntomas característicos de la HD, ya fuera en una etapa avanzada, con un diagnóstico clínico de HD, o en etapa inicial, por lo tanto solo se tienen los datos de la edad de inicio en estos 7 casos. En nuestro estudio, la edad de inicio de la enfermedad se basa en la información provista por el paciente y/o un familiar cercano y se define como la edad cuando aparecen los primeros síntomas que representan un cambio permanente con respecto al estado normal. La edad promedio de inicio para la población en estudio fue de 39.3 ± 10.6 años (ámbito: 28-53 años).

Si vemos la distribución del número de casos estudiados (Cuadro 5), a los que se les realizó el diagnóstico molecular y para los cuales se tiene la edad de inicio (n=7), según la edad a la cual comenzaron a presentar los síntomas, la mayoría desarrollaron la HD en la cuarta década de vida.

Cuadro 5. Distribución del número de personas afectadas en 4 familias costarricenses donde segrega el gen de la HD según la edad de inicio de la enfermedad

Número de individuos afectados	Edad (años)
1	< 30
4	30-50
2	> 50

Con respecto a la edad de inicio, un aspecto interesante de recalcar es el caso de la paciente III.7 de la familia #1 y la III.14 de la familia #3, ya que ambas presentan el mismo número de repeticiones (47 CAG) en el alelo expandido, sin embargo, hay una gran variabilidad en la edad de inicio, aunque hay que recalcar la dificultad para establecer la edad en que los pacientes manifestaron sus primeros síntomas.

Los individuos afectados con la HD pueden ser clasificados en 3 diferentes grupos, como se muestra a continuación:

Cuadro 6. Clasificación clínica de pacientes costarricenses con la HD según la edad de inicio y los síntomas clínicos

No. de individuos	Clasificación clínica
0	HD juvenil (<20años)
5	HD clásica-típica (21-50 años)
2	HD tardía (>50años)

Con respecto a como se está transmitiendo la mutación entre generaciones, en el cuadro 7 vemos que a pesar del poco número de casos, se observa una leve disminución

en la edad de inicio de la HD con respecto a un incremento en el tamaño de la mutación entre las generaciones, sin embargo el cambio no es muy evidente.

Cuadro 7. Relación entre la edad de inicio de la HD versus el tamaño promedio de la mutación a través de las generaciones en pacientes de 4 familias de Costa Rica

Generación	Edad de inicio (promedio)	Tamaño de la mutación (promedio)
Primera Generación	No hay datos	No hay datos
Segunda Generación	41.5 años (n=4)	45.5 repeticiones (n=4)
Tercera Generación	36.3 años (n=3)	47 repeticiones (n=3)

Cuando se analizan estos casos en conjunto, no por generaciones, se puede observar que la edad de inicio está relacionada estadísticamente con el número de repeticiones CAG en el alelo expandido ($r = -0.914$, $P < 0.01$) (Fig. 11). La correlación es negativa y esto significa que entre mayor sea el número de repeticiones, la enfermedad se presenta a edades más tempranas.

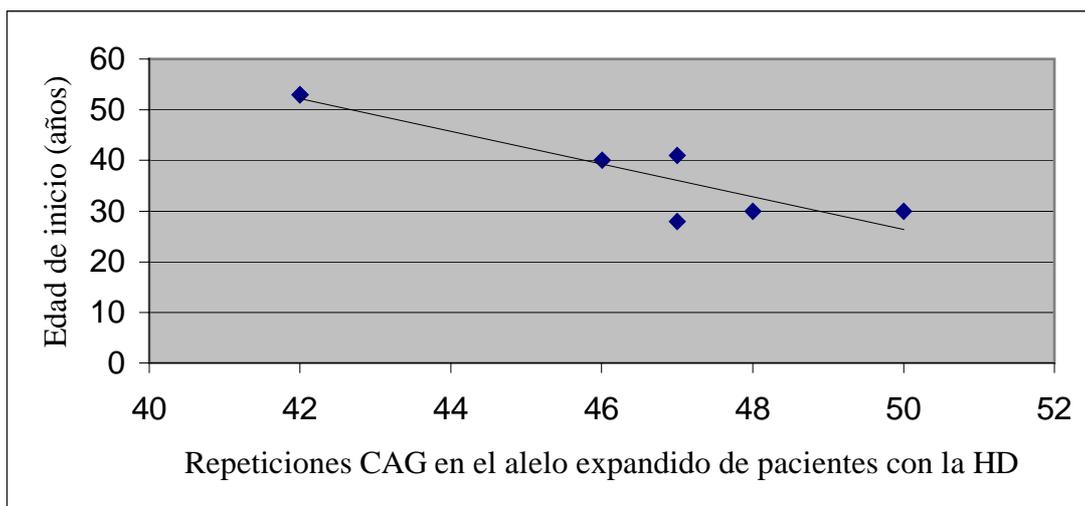


Figura 11. Relación entre la edad de inicio de la HD y el tamaño de la mutación

Entre la edad de inicio y el número de repeticiones en los alelos normales de los individuos en los que se detectó la mutación se encontró una correlación baja ($r=-0.166$, nivel de significancia 1%) (Fig.12).

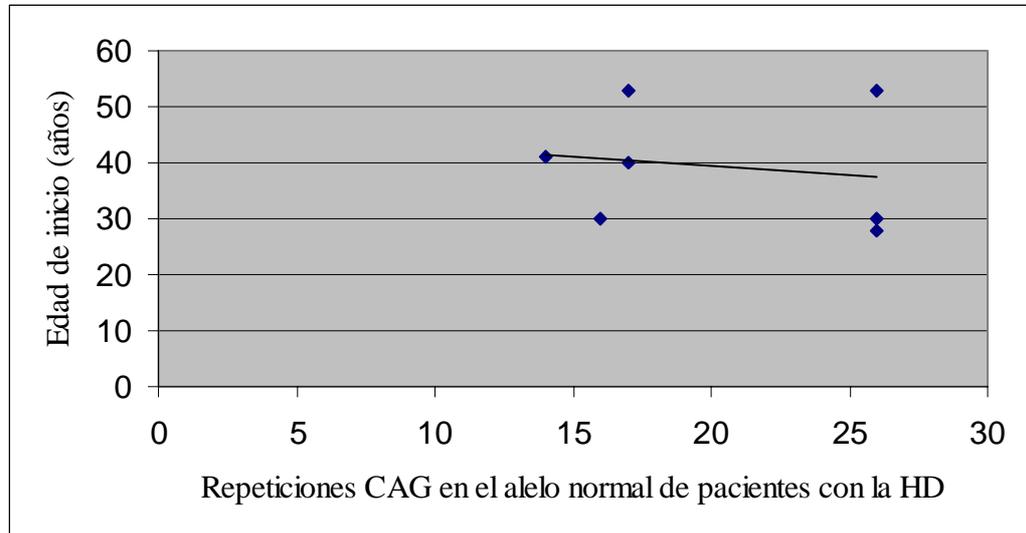


Figura 12. Relación entre la edad de inicio de la HD y el número de repeticiones en el alelo normal

DISCUSION

Éste es el primer estudio que se realiza en Costa Rica sobre la enfermedad de Huntington, en el cual hemos identificado las primeras 4 familias portadoras de la mutación en el gen de la HD en nuestro país. Sin embargo, ya están identificadas también 4 familias más, de las cuales no se cuenta con información molecular pero se espera poder analizarlas próximamente.

La Enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del Sistema Nervioso Central (SNC). La prevalencia está estimada entre 5 y 10 personas afectadas por cada 100 000 habitantes, entre poblaciones de Europa Occidental y descendientes de estas poblaciones (poblaciones caucásicas), pero la HD es menos frecuente en otros grupos (Japón, China, y negros africanos) (Harper 1992).

En Costa Rica no se conoce la prevalencia de la HD, ya que no se sabe en cuántas familias costarricenses está segregando la mutación que causa la enfermedad ni el número de personas que están afectadas, por lo que este proyecto representa un esfuerzo para establecer por primera vez el diagnóstico molecular para la HD y contar en un futuro con este dato. Sin embargo, es de esperar que la prevalencia de la HD en la población costarricense sea similar a la observada en caucásicos, debido a que la población general de Costa Rica –de acuerdo con fuentes documentales e históricas– está constituida por la amalgama de, esencialmente, mediterráneos europeos, indígenas americanos y africanos occidentales. De acuerdo con algunas investigaciones, el genotipo promedio de la población costarricense está conformado por una mezcla acumulada de genes de origen caucásico (61%), seguido por el aporte amerindio (30%) y el africano (9%) (Morera *et al.* 2003).

Se estima que por cada individuo afectado con la HD hay 2 personas que portan la mutación, las cuales están todavía jóvenes para manifestar los síntomas. La prevalencia de los genes portadores de la mutación que causa la HD en la población caucásica general se estima entre 15 y 30 personas por cada 100 000 (Myers *et al.* 1999). Por lo tanto, según lo anterior es de esperar que en Costa Rica existan entre 675 y 1350 personas con la mutación, tanto afectados clínicamente como asintomáticos.

La HD es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, que suele manifestarse en edades adultas. Previo al descubrimiento del gen de la HD, el diagnóstico clínico definitivo debía hacerse en la presencia de: una historia familiar positiva consistente con una herencia autosómica dominante, una discapacidad motora progresiva involucrando

movimientos voluntarios e involuntarios y trastornos mentales incluyendo deterioro cognitivo, trastornos afectivos y/o cambios en la personalidad (Kremer 2002).

Desde que en 1983 se localizó el primer marcador genético asociado a la HD en el cromosoma 4, se iniciaron protocolos para establecer el diagnóstico de la HD por estudios de ligamiento. Pero, no fue sino hasta que se identificó el gen de la HD en 1993 y se caracterizó la mutación, que se pudo desarrollar un diagnóstico molecular directo de ella mucho más simple. Esto permite examinar el número de repeticiones de la tripleta CAG para detectar la presencia o ausencia de la mutación en la HD. Actualmente las alternativas que existen para realizar el diagnóstico molecular en estos individuos incluyen metodologías basadas en la PCR con la posterior detección de los fragmentos en geles de poliacrilamida mediante marcaje radiactivo o tinción con plata, southern blot y/o secuenciación. Después de revisar las diferentes opciones se optó por la detección no isotópica por ser una técnica más simple, barata, segura y rápida.

Gracias a que se pudo establecer el diagnóstico molecular de la HD en Costa Rica y después de haber realizado el examen molecular a todos los individuos que participaron en este estudio, se logró confirmar el diagnóstico clínico de la HD en los casos índices y por lo tanto la presencia de la HD en las 4 familias estudiadas. En el caso de los 31 individuos en riesgo, gracias al diagnóstico molecular, cada uno de ellos conoció con certeza si son o no portadores de la mutación y la posibilidad de heredarla a sus hijos(as). Se encontró que de los 31 individuos en riesgo a los cuales se les realizó el diagnóstico presintomático, un 35.5% resultaron ser portadores de la mutación, una cifra definitivamente diferente del 50% esperado. Sin embargo, muy probablemente esto es debido a la presencia de probandos con un riesgo a priori de 25% en el grupo estudiado. Estos probandos son individuos cuyos padres, que si tenían un riesgo del 50%, estaban siendo estudiados simultáneamente y no existía seguridad de que fueran portadores de la mutación.

Las familias afectadas por este tipo de padecimientos tienen derecho, si lo desean y hasta donde el conocimiento actual lo permite, a entender la naturaleza de la enfermedad, a saber el tamaño de la amplificación que portan y las implicaciones que esto puede tener en sus descendientes. Este tipo de proyectos brinda la posibilidad de identificar individuos portadores del gen alterado antes del desarrollo de los síntomas, lo cual le permite a los familiares de los pacientes afectados elegir si desean saber su condición de portador o no portador, con el fin de poder tomar las decisiones pertinentes con respecto a la formación de sus familias. Esta es la mejor forma de controlar la

transmisión de la enfermedad en la descendencia y reducir la recurrencia de esta patología en las familias. Además, en el caso de las personas que no heredaron la mutación, permite aliviar la preocupación respecto al riesgo de presentarla y transmitirla.

El estudio de las repeticiones CAG en el gen *HD*, permite entonces la confirmación del diagnóstico clínico de la HD, así como una evaluación presintomática. Aunque no se puede considerar el diagnóstico presintomático como una medida de prevención primaria, puesto que sólo se realiza de forma voluntaria por parte de los individuos en riesgo y el objetivo de estos individuos no siempre es el de evitar la transmisión a su descendencia, se puede considerar que tendrá algún efecto de prevención en la población donde se lleva a cabo la prueba

Se ha observado que las razones o motivaciones más importantes para someterse al diagnóstico presintomático son: la necesidad de conocer con certeza si se es portador(a) de la mutación o no, para tomar decisiones reproductivas (planificación) y para informar a los hijos sobre el riesgo de heredar la HD. Por otra parte las barreras para no hacerse la prueba genética son: el no sentirse capaz de hacer frente a un resultado desfavorable, el sentimiento de que las decisiones importantes no tienen que depender del resultado de un examen molecular, prefieren seguir con la incertidumbre que con la certeza de un resultado desfavorable, la falta de una cura para la HD, la preocupación sobre la reacción de los hijos y compañero(a) y finalmente el requisito de tener que asistir a las sesiones previas al diagnóstico presintomático (Solís *et al.* 2001 y Evers-Kiebooms *et al.* 2002).

Son pocos los estudios que se han hecho sobre las decisiones reproductivas tomadas después del resultado del diagnóstico presintomático en familias donde segrega la HD, a diferencia del gran número de estudios sobre el impacto psicológico de la prueba.

Un estudio colaborativo europeo (Evers-Kiebooms *et al.* 2002) se basó en los resultados de 7 centros genéticos en 6 países europeos (Bélgica, Holanda, Italia, Reino Unido, Francia y Grecia). El principal objetivo del estudio fue evaluar si el resultado del diagnóstico presintomático para la HD tuvo un impacto o efecto sobre las decisiones reproductivas tomadas, comparando portadores y no portadores de la mutación HD, quienes estaban en edad reproductiva cuando recibieron el resultado del diagnóstico presintomático. Los datos fueron colectados para 180 portadores y 271 no portadores de la mutación. La edad promedio del grupo total estudiado fue 31.5 años y en más de la

mitad del grupo el intervalo de seguimiento fue de 3 años o más, con un máximo de 7 años.

El estudio claramente reveló un impacto del resultado de la prueba presintomática sobre la subsecuente reproducción: 14% de los portadores tuvieron uno o más embarazos subsecuentes versus 28% de los no portadores. En el subgrupo que reportó, en el período previo al diagnóstico, la planificación familiar como el principal motivo para realizarse el diagnóstico presintomático y con un intervalo de seguimiento de al menos 3 años, el efecto fue más pronunciado: 39% de los portadores de la mutación HD tuvo embarazos posteriores versus 69% de los no portadores. A pesar del deseo manifestado durante el período previo al diagnóstico de tener hijos y del planeamiento familiar como una de las razones para aplicar al diagnóstico presintomático, la mayoría de los portadores no tuvo embarazos subsecuentes después de 3 a 7 años de seguimiento (Evers-Kiebooms *et al.* 2002).

En cualquier caso, el efecto que el diagnóstico presintomático u otras medidas puedan tener sobre la prevalencia de la enfermedad sólo podrá detectarse en el caso de disponer de un registro, que además permitiría ofrecer de forma adecuada el diagnóstico presintomático a toda la población en riesgo.

Debido a que por el momento el tratamiento es sintomático y mientras no se pueda “curar” la condición de portador de la mutación, la prevención primaria de la ocurrencia de esta patología se basa en la asesoría genética adecuada y oportuna a los miembros de la familia afectada, y para lograr esto es indispensable implementar el diagnóstico molecular de la HD.

Por otra parte, gracias a esta investigación se pudo divulgar conocimientos y educar a las familias afectadas, ya que, a pesar de que la mayoría de los individuos estudiados conocían en algún grado las características clínicas de la enfermedad, pues habían visto a algún miembro de sus familias padecerla, tenían muchas dudas en cuánto al patrón de herencia y los riesgos de transmisión. Inclusive, a pesar de que los casos índices estudiados ya tenían un diagnóstico clínico de la HD, cuando se les preguntaba a los familiares en riesgo cuál era la enfermedad que se estaba presentando en sus familias, muchos no estaban totalmente seguros, y mencionaban otras enfermedades. Por lo tanto, al menos en las familias estudiadas, se logró llenar un gran vacío en cuánto a información sobre la enfermedad.

En general, los análisis genéticos son de gran utilidad en la confirmación del diagnóstico clínico y en el diagnóstico presintomático, sin embargo, hay que tener claro

que estos diagnósticos no pueden predecir cuándo empezarán los síntomas ni cómo será la evolución de la enfermedad. Asimismo, existen muchos cuadros clínicos que presentan trastornos del movimiento y que podrían confundirse con la enfermedad de Huntington, por lo que en estos casos de duda, el diagnóstico genético es de gran ayuda para establecer un diagnóstico clínico correcto. Dentro de las familias que están pendientes de analizar sabemos, por la información clínica, que existe una en la que el diagnóstico clínico es dudoso y no se sabe con certeza si se trata de la HD o de una enfermedad conocida como neuroacantosis o corea acantósica. Por lo tanto se espera en un futuro cercano confirmar, mediante el diagnóstico molecular, si se trata de la HD.

El reconocimiento de la HD, basándose en la triada clásica de síntomas reconocidos por George Huntington desde 1872, más una historia familiar positiva de la enfermedad, permanece como el núcleo del diagnóstico clínico. Usando estos criterios clínicos, entre el 85% y 93% de los individuos con la HD pueden ser diagnosticados correctamente (Kremer 2002).

A pesar de estos criterios frecuentemente se hacen diagnósticos equivocados. En una revisión en una comunidad en el estado de Maryland, 11% de 212 pacientes habían recibido un diagnóstico incorrecto de la HD, mientras que en 15% de ellos, a pesar de un examen clínico profundo no se pudo afirmar si tenían la HD. El descubrimiento del gen *HD* y su mutación patogénica cambió esta situación. El diagnóstico molecular basado en la amplificación por la PCR de las repeticiones expandidas, ha permitido tener una prueba diagnóstica con una sensibilidad y especificidad de casi el 100%. Incluso en ausencia de una historia familiar positiva, este método nos lleva a un diagnóstico correcto. Los problemas que confrontan los médicos hoy en día son: pacientes con un trastorno motor no típico, que resultan tener la HD o pacientes con corea y quizás problemas cognitivos o psiquiátricos que resultan tener una repetición CAG expandida (Kremer 2002).

Según la distribución por sexo, de los 18 individuos con la mutación, tanto hombres como mujeres son afectados en, aproximadamente, iguales proporciones, o sea, la incidencia para la HD es igual sin importar el sexo, como es típico en las enfermedades mendelianas autosómicas. Los estudios que han analizado la incidencia anual de la HD, estiman un promedio de 2-4 casos nuevos de HD sintomáticos por millón de habitantes (Ramos-Arroyo *et al.* 2005). Si observamos las genealogías de cada familia, otra característica evidente que vale la pena recalcar es que, generaciones

sucesivas en una misma familia están afectadas. Además, también vemos que tanto hombres como mujeres son responsables de la transmisión. En nuestro estudio, la transmisión de la enfermedad fue materna en 8 casos y paterna en 10 casos, por lo que no hay diferencias en la transmisión de alelos expandidos de acuerdo al género del progenitor transmisor. Todas las anteriores características presentes en estas familias en las que se segrega la HD, son un reflejo de un patrón de herencia autosómico dominante.

Nuestros análisis moleculares han mostrado un perfil del número de repeticiones CAG que se encuentra dentro de intervalos previamente reportados en otras poblaciones a nivel mundial, como se observa en el cuadro 8.

Cuadro 8. Intervalos de repeticiones CAG normales y patológicos encontrados en pacientes con la HD en diferentes estudios a nivel mundial.

Población estudiada	No. Repeticiones CAG		Estudio / referencia
	Intervalo Normal (N)	Intervalo Patológico(N)	
Costa Rica	14-28 (N=18)	42-55 (N=18)	Este estudio
Venezuela	14-34 (N=443)	40-86 (N=443) 40-58 (N=377) HD Clásica	Wexler <i>et al.</i> 2004
México	11-23 (N=86)	37-76 (N=86)	Alonso <i>et al.</i> 1997
India	9-33 (N=250)	36-82 (N=49)	Saleem <i>et al.</i> 2003
Canadá	11-37 (N=360)	38-121(N=360)	Andrew <i>et al.</i> 1993
Brasil	18-26 (N=32)	43-73 (N=32)	Lima e Silva <i>et al.</i> 2000
España	12-32 (N=60)	40-85 (N=86)	Sánchez <i>et al.</i> 1996
Turquía	10-35 (N=122)	38-78 (N=127)	Akbas y Erginel- Unaltuna 2003
Nueva Zelanda	9-27 (N=100)	37-70 (N=100)	Whitefield <i>et al.</i> 1996

Los alelos normales más comunes a nivel mundial poseen 17 y 19 repeticiones CAG (Potter *et al.* 2004), en nuestro estudio el alelo normal más frecuente posee 17 repeticiones. Por otra parte no es sorprendente que no se hayan encontrado alelos intermedios, ya que las repeticiones en este intervalo son raras. Aproximadamente 1.5% a 2% de la población general lleva alelos en este intervalo, asimismo, los alelos de penetrancia reducida también son raros en la población (Potter *et al.* 2004).

Las secuencias de trinucleótidos repetidos, asociados a trastornos genéticos como la enfermedad de Huntington entre otros, muestran un grado elevado de variación en la población normal (en nuestro caso se encontraron 8 alelos diferentes presentes en los individuos en los que no se encontró la mutación), que siempre tiene un número de repeticiones bajo que se mantiene de generación en generación.

Sin embargo, las secuencias de trinucleótidos repetidos tienen un umbral definido para el tamaño de las repeticiones a partir del cual la secuencia se vuelve altamente inestable tanto en células somáticas, como en germinales, observándose un mosaicismo somático y una variabilidad intergeneracional típicos de estas enfermedades (Richards y Sutherland 1997). Aunque no se sabe exactamente qué es lo que lleva a las secuencias de repeticiones cortas a llegar a ese tamaño umbral, una posible explicación consiste en la acumulación lenta de pequeños incrementos en el número de repeticiones (Parniewski y Staczek 2002).

Este mecanismo de cambios en un número pequeño de repeticiones puede dar lugar a aumentos o pérdidas en el número de repeticiones y es el mecanismo de inestabilidad que ocurre generalmente en los microsatélites. Este mecanismo consiste en el deslizamiento de las dos cadenas complementarias posterior a una desnaturalización en la región de las repeticiones, formándose bucles de pocas unidades. Estos bucles, si no son reparados, durante la replicación van a producir pequeñas expansiones o contracciones. Si los bucles son reparados, también pueden producirse expansiones o contracciones de pocas unidades. Una vez que se ha llegado al tamaño umbral, las secuencias largas de repeticiones se vuelven muy inestables, produciéndose grandes expansiones mediante un mecanismo posiblemente distinto del responsable de la inestabilidad de las secuencias cortas (Parniewski y Staczek 2002).

Un factor importante para la inestabilidad de las repeticiones de trinucleótidos es la secuencia por sí misma. Pero también hay elementos que actúan en cis que afectan la inestabilidad de las repeticiones de trinucleótidos. Los elementos en cis son aquellos que afectan a la formación y estabilidad de estas estructuras secundarias en la región de las repeticiones. Entre ellas se encuentran el tamaño (número de copias), la pureza o composición de las repeticiones (si está o no interrumpida por otras tripletas), las secuencias que flanquean la región de las repeticiones y el contexto cromosómico de la secuencia o condiciones epigenéticas como la dirección de la replicación, la proximidad al origen de replicación, la estructura de la cromatina, la metilación del ADN, la posición de los nucleosomas, etc (Richards 2001; Cleary y Pearson 2003).

Todos los modelos propuestos para explicar las expansiones de trinucleótidos repetidos se basan en la evidencia de que estas secuencias tienen una propensión a formar estructuras secundarias *in vitro* (Sinden *et al.* 2002). De este modo, se ha propuesto que la formación de estas estructuras *in vivo* son la principal fuente de inestabilidad genética de las repeticiones, ya que su presencia podría tener un impacto significativo en los procesos metabólicos del ADN que se den en la región de las repeticiones, como la replicación, la transcripción, la reparación y/o la recombinación. Sin embargo, por el momento se carece de evidencia directa para apoyar dicha afirmación. Las secuencias de trinucleótidos repetidos presentan unas características inherentes a la secuencia misma que permiten una mayor flexibilidad de la doble hélice y la formación de varias estructuras alternativas a la forma canónica B-ADN. Estas estructuras secundarias incluyen horquillas de cadena sencilla, cadenas triples o cuádruples de ADN y deslizamientos entre las dos cadenas con la formación de pequeños bucles y/o horquillas.

También hay que destacar que en diferentes tejidos y en momentos diferentes del desarrollo, los elementos repetitivos de loci específicos, muestran niveles variables de inestabilidad, sugiriendo mecanismos diferentes entre los distintos loci y entre tejidos. Esto sugiere que elementos en cis específicos de tejido, desarrollo y locus contribuyen a la inestabilidad de las tripletas repetidas. No obstante, dada la compleja naturaleza de las mutaciones dinámicas, es probable que tanto elementos en cis como factores en trans actúen de manera conjunta para producir una inestabilidad específica de tejido, desarrollo y locus, probablemente a través de los procesos de replicación del ADN, reparación y/o recombinación (Cleary y Pearson 2003).

Parece claro que existe una conexión entre la inestabilidad de los trinucleótidos y la replicación del ADN. Durante la replicación del ADN se pueden producir errores de inserción/delección de bases por deslizamientos entre la cadena naciente y la cadena molde. Por su naturaleza repetitiva, las secuencias de trinucleótidos son perfectos candidatos para el deslizamiento de las cadenas ya que pueden formar estructuras secundarias (Parniewski y Staczek 2002). Otro de los modelos propuestos para la inestabilidad involucran el procesamiento aberrante de los fragmentos de Okazaki iniciados dentro de la región de las repeticiones (Gordenin *et al.* 1997). Según este modelo, cuando en el extremo 5' de los fragmentos de Okazaki se encuentran secuencias repetidas, éstas pueden formar estructuras secundarias resistentes a la endonucleasa FEN-1, proporcionando el paso inicial para la generación de grandes expansiones. La

FEN-1 es la endonucleasa responsable de eliminar el fragmento de cadena sencilla que se genera en el extremo 5' de los fragmentos de Okazaki, durante la síntesis de la cadena discontinua, cuando la ADN polimerasa encuentra el extremo 5' del siguiente fragmento de Okazaki y lo desplaza.

El proceso de transcripción de la región de las repeticiones es un factor potencial para influir en la inestabilidad de las repeticiones, pues supone la separación de las dos cadenas complementarias, permitiendo la formación de estructuras secundarias de las secuencias de repeticiones. Al igual que el efecto de la replicación en la estabilidad de las secuencias repetidas, el efecto de la transcripción, también depende del tamaño y la composición de la secuencia (Parniewski y Staczek 2002).

Las estructuras secundarias que se forman dentro de las tripletas repetidas durante la síntesis del ADN pueden alterar la estabilidad de las mismas si no son eliminadas mediante la reparación del ADN. Existen varios puntos de vista sobre el efecto de la reparación del ADN en la inestabilidad de trinucleótidos. Uno de ellos supone que las estructuras secundarias que se forman dentro de las repeticiones de trinucleótidos durante la síntesis del ADN, pueden alterar la estabilidad de las mismas y bloquear la reparación del ADN, de modo que incluso las células con reparación normal no pueden evitar las expansiones o contracciones de estas secuencias (Lahue y Slater 2003).

El sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) es un sistema fundamental involucrado en el mantenimiento de la integridad genómica, porque además de corregir los pares de bases mal apareados, también repara algunas estructuras secundarias alternativas del ADN, como pequeños bucles de inserción/delección que se producen como consecuencia del deslizamiento de la ADN polimerasa durante la síntesis del ADN.

Las mutaciones en los genes implicados en la vía MMR producen un incremento en la tasa de mutación y una elevada inestabilidad en los microsatélites, sugiriendo la posible implicación del sistema MMR en la inestabilidad de las tripletas repetidas. Al igual que en otros microsatélites, el sistema MMR juega un papel corrector en la rectificación de pequeños bucles de tripletas repetidas que se producen durante la replicación, evitando las pequeñas mutaciones de tripletas repetidas. De esta manera, los defectos en el MMR producen un incremento de pequeñas expansiones y contracciones en casi todos los microstélites (Lahue y Slater 2003).

Las repeticiones inestables pueden estar localizadas en las regiones no traducibles 5'-UTR y 3'-UTR, en regiones intrónicas y en regiones codificantes. Las expansiones repetidas pueden causar las diferentes enfermedades debido a alteraciones en los procesos de transcripción, o por alteraciones en el producto génico. En el caso de la HD, las expansiones CAG codifican para residuos de glutamina. Este mismo tipo de expansión inestable de tripletas CAG, ha sido encontrado en otros trastornos degenerativos y la función de muchos de los genes involucrados en estas enfermedades se desconoce. Sin embargo, evidencia reciente obtenida de estudios de la proteína así como de modelos de animales transgénicos, sugieren que las proteínas que contienen un tracto de glutaminas expandido adquieren una función nueva que es tóxica (Martín-Aparicio y Lucas 2002; Cattaneo *et al.* 2003). Las expansiones de poliglutamina son uno de los mecanismos patológicos más intrigantes que causan trastornos neurodegenerativos de la vida adulta. Mientras que el producto génico normal tolera una amplia variación en el tamaño del tracto de poliglutamina, más allá de un umbral, las proteínas adquieren propiedades patogénicas (Li 1999; Martín-Aparicio y Lucas 2002).

Las repeticiones CAG expandidas que codifican trectos de poliglutamina, dan como resultado una proteína tóxica que lleva a la muerte del tejido neuronal, particularmente dentro del núcleo caudado y el putamen. Es posible que algunos factores como la modificación del tracto de poliglutamina y/o el contexto de la proteína en el cual se localizan los trectos de poliglutaminas contribuyen a la toxicidad celular específica (Richards 2001).

En la gran mayoría de las transmisiones, tanto maternas como paternas, la repetición expandida (aproximadamente entre 40 y 50 repeticiones) es inestable y sutilmente alterada, incrementando o disminuyendo en una o pocas repeticiones CAG de una generación a la siguiente (Laccone y Christian 2000). En las transmisiones meióticas que se pudieron documentar en este estudio, los cambios son pequeños, de solamente unas pocas repeticiones CAG (entre 3 y 5 repeticiones), además es importante recordar que las repeticiones expandidas estuvieron entre 42 y 55 repeticiones CAG.

Aunque la inestabilidad es independiente de la herencia materna o paterna y a pesar de que la magnitud de los cambios observados fue pequeña, hay una tendencia hacia la expansión o contracción de las repeticiones, determinada por el sexo del progenitor que está transmitiendo la enfermedad. Mientras que en las transmisiones

maternas se tiende a las contracciones, en las paternas por el contrario incrementa el número de repeticiones en la siguiente generación.

Kremer *et al.* (1995) encontraron que las expansiones grandes son casi exclusivas de las transmisiones paternas. Aproximadamente 21% de las transmisiones paternas están asociadas con expansiones grandes. En contraste, las expansiones sólo son observadas en 0.7% de las transmisiones maternas y las contracciones ocurren más frecuentemente en los alelos derivados de la madre.

Las expansiones de las repeticiones CAG vía materna, han sido reportadas solamente en 20% de los casos juveniles de HD y raramente las expansiones sobrepasan las 20 repeticiones (Sánchez *et al.* 1997). Cannella *et al.* (2004) reportaron un promedio de expansión intergeneracional de +7.3 repeticiones en las transmisiones paternas y de +0.7 repeticiones en las transmisiones maternas. La expansión intergeneracional más grande que ha sido reportada es de +160 repeticiones, donde un padre con 54 repeticiones tuvo un hijo con 214 repeticiones (Seneca *et al.* 2004). Nance *et al.* (1999) reportó un caso de HD de inicio juvenil, con 250 repeticiones en un paciente con una historia materna de HD, sin embargo no se tuvo disponible una muestra de ADN para confirmar el tamaño del alelo de la madre. Laconne y Christian (2000) describieron 2 hermanas con HD, las cuales heredaron expansiones vía materna de +21 y +30 repeticiones. La expansión intergeneracional más grande, vía materna, que ha sido reportada (y confirmada molecularmente) es de +60 repeticiones, donde una madre con 70 repeticiones CAG heredó a su hija un alelo con 130 repeticiones (Nahhas *et al.* 2005).

Ya se ha visto que el sexo del progenitor transmisor es uno de los elementos más importantes que influyen en la estabilidad de los alelos HD. Varios estudios han mostrado que los alelos CAG expandidos son particularmente inestables durante la transmisión a través de la línea germinal masculina (Laconne y Christian 2000), y es más probable que las transmisiones paternas produzcan grandes expansiones, que causan la HD juvenil. En nuestro estudio no se presentó ningún caso de HD juvenil y tampoco se observaron expansiones grandes o dramáticas en las transmisiones paternas, lo cual pudo influir en el hecho de que no se presenten diferencias significativas en el tamaño de las repeticiones CAG expandidas entre pacientes en los que la transmisión fue paterna y aquellos con transmisión materna. Se ha demostrado en estudios del ADN de esperma de hombres con la HD, una alta variabilidad de tamaños de las repeticiones

CAG en los alelos, o sea, se ve un patrón de mosaicismo gamético (Duyao *et al.* 1993; Telenius *et al.* 1995).

La inestabilidad de las repeticiones CAG en tejidos somáticos de muchos pacientes con la HD también ha sido reportada. Telenius *et al.* (1994), detectó cambios pequeños en el tamaño de las repeticiones, sin embargo, recientemente Kennedy *et al.* (2003), encontraron grandes cambios en tejido cerebral. La causa de estas expansiones somáticas y su potencial papel en influenciar el inicio de la enfermedad no se ha determinado todavía.

El proceso fundamental que participa en la inestabilidad de las repeticiones CAG es desconocido, pero la comparación de la herencia estable de alelos normales con el comportamiento inestable de los trectos de repeticiones CAG expandidas, demuestra que la inestabilidad es dependiente de la longitud del tracto de CAGs tanto en las transmisiones maternas como paternas. Por otra parte, la observación de mosaicismo en esperma y el descubrimiento que los gemelos monocigóticos tienen un tamaño de repetición idéntico, señala a la gametogénesis como la fuente principal de la inestabilidad, sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular exacto que causa grandes expansiones durante la gametogénesis en los hombres. En hombres con la HD, el mosaicismo gamético en esperma tiende a incrementar con la longitud de las repeticiones CAG constitucionales. El mosaicismo gamético no ha sido mostrado directamente en mujeres, pero similitudes con la mayoría de las transmisiones en hombres sugiere que la inestabilidad materna ocurre probablemente durante la ovogénesis (Wheeler *et al.* 1999). Es probable que repeticiones sustancialmente grandes puedan exhibir inestabilidad meiótica comparable tanto en alelos maternos como paternos (Nahhas *et al.* 2005).

La diferencia en el comportamiento de la expansión en los alelos HD entre hombres y mujeres sugiere que hay efectos de la gametogénesis específicos del sexo sobre la estabilidad intergeneracional o cambios intergeneracionales vistos en el número de repeticiones CAG. Como se mencionó anteriormente, en un principio, pequeños deslizamientos de la ADN polimerasa pueden llevar gradualmente a una expansión, hasta que se alcanza un número crítico de repeticiones, los cuales podrían sufrir luego grandes expansiones por la formación de horquillas. Este mecanismo de expansión puede ser más eficiente en la línea germinal masculina debido a la continua división celular de los espermatogonios a través de la vida adulta. Esto podría también explicar la tendencia a incrementar las longitudes de repeticiones en la progenie, como una

función de la edad paterna. Sin embargo, a la fecha no hay una explicación convincente para la potencial expansión diferencial del padre transmisor (Laccone y Christian 2000).

Algunos estudios sobre el mecanismo patológico de las expansiones de poliglutamina indican un efecto tóxico de las proteínas mutadas sobre poblaciones celulares específicas. Según la hipótesis de Laccone y Christian (2000), las expansiones y contracciones de repeticiones CAG inestables pueden ocurrir en ambos géneros durante el desarrollo embrionario. Hasta la pubertad, todos los ovocitos primarios se detienen en la primera profase meiótica hasta la maduración. Ellos sugieren que en trastornos donde la proteína es expresada en los ovocitos, como en el caso de la HTT, los ovocitos primarios sufren muerte celular programada durante este período de descanso, y aquellos con los trectos de poliglutamina más largos son eliminados primero, causando un enriquecimiento relativo de ovocitos con pocas repeticiones CAG. La probabilidad de transmisión de repeticiones CAG más largas por mujeres que portan una expansión de CAGs podría correlacionar inversamente con la edad materna en el momento de la concepción. El corolario de esto es que mujeres embarazadas más viejas pueden tener una mayor probabilidad de transmitir alelos con repeticiones contraídas. En un estudio realizado por Sato y colaboradores (1999), se examinaron los cambios intergeneracionales de repeticiones CAG expandidas en pacientes con atrofia dentato-rubral palidoluisiana (DRPLA) y encontraron un incremento en el número de repeticiones CAGs dependiente de la edad, entre hombres transmisores y una tendencia, dependiente de la edad, a la contracción entre mujeres transmisoras. Notablemente la transmisión, a través de la línea germinal femenina, de alelos de tamaño aumentado en la progeñie, estuvo restringida a mujeres jóvenes.

Con respecto a la edad de inicio en el grupo estudiado, a pesar de los pocos datos con los que contamos, es evidente que al igual que se ha reportado en otros estudios, la mayoría de los pacientes manifiestan la HD entre la cuarta y la quinta década de vida, lo cual coincide con la HD clásica caracterizada por corea, pérdida gradual del procesamiento de pensar y de la adquisición de habilidades intelectuales, problemas de memoria, desorientación, etc. En las personas que manifiestan los primeros síntomas después de los 50 años, la progresión de la enfermedad es más lenta, incluso, los síntomas pueden enmascarse por otros problemas de salud, muestran signos de depresión antes que cólera o irritabilidad y pueden conservar un control marcado de sus funciones intelectuales: memoria; razonamiento; resolución de problemas. Finalmente, en la HD juvenil, que en este estudio no se observó ningún caso, un signo común es el

rápido deterioro en el funcionamiento escolar. Se presentan cambios sutiles en la escritura y ligeros problemas con los movimientos, tales como rigidez, temblores y sacudidas musculares rápidas: *mioclonías*. Además convulsiones y discapacidades mentales y la enfermedad progresa más rápidamente (Kremer 2002).

El factor más importante que influencia la edad de inicio en la enfermedad de Huntington es la longitud de las repeticiones expandidas CAG. Varios estudios han mostrado que el número de repeticiones del trinucleótido CAG se correlaciona de forma inversa con la edad a la cual la enfermedad comienza a manifestarse (Duyao *et al.* 1993; Myers *et al.* 1999a; Potter *et al.* 2004; Wexler *et al.* 2004). Expansiones entre 40 y 50 repeticiones CAGs son vistas frecuentemente en personas donde la edad de inicio de la enfermedad se presenta en la vida media, como en nuestro caso, mientras que repeticiones más largas causan la HD de inicio juvenil (Petersen *et al.* 1999).

Las expansiones en los alelos mutados encontrados en este estudio están entre las 42 y 55 repeticiones CAG, sin embargo, a pesar de que son muchos los estudios en los que se ha visto que la correlación entre la edad de inicio y el tamaño de la expansión es fuerte, mucho del efecto es visto entre la pequeña fracción de individuos que tienen expansiones grandes (≥ 70 CAGs) y edad de inicio temprano o juvenil (10%). En el 90% de todos los casos, donde la edad de inicio se presenta en la vida adulta, la correlación entre el tamaño de la expansión y la edad de inicio no es lo suficientemente fuerte y significativa para ser útil en la predicción del inicio entre personas que todavía son asintomáticas (Myers *et al.* 1999a).

Según lo mencionado anteriormente, es de esperar que en el grupo estudiado se observe una correlación débil entre la edad de inicio y el número de repeticiones CAG, sin embargo vemos que la correlación negativa es fuerte ($r = -0.914$). Esto probablemente se deba a que para este análisis se contaba con una muestra muy pequeña, ya que en nuestro estudio, solo 7 pacientes ya han desarrollado la enfermedad y para los cuales se tiene la edad de inicio de los síntomas. El resto de los individuos ($n=11$), en los que se detectó la mutación, permanecen asintomáticos hasta el momento. También pudo influir el hecho de que en nuestros casos la edad de inicio de la enfermedad se basa en la información provista por el paciente y/o un familiar cercano y podría ser un dato poco confiable. Es muy frecuente que algunos afectados o sus familiares no pongan atención a la aparición de las primeras manifestaciones, e inclusive se consideren sanos.

Debido a la correlación clínica que existe entre la edad de manifestación y el tamaño de la expansión, en esta enfermedad se puede presentar el fenómeno de anticipación genética. La disminución que experimenta la edad de inicio a través de las generaciones en los pacientes de las familias costarricenses, pareciera ser debido al leve incremento en el tamaño promedio de la mutación. Sin embargo, en las familias estudiadas hasta el momento no se ha observado claramente este fenómeno de anticipación. Hay que recordar que esta relación podría estar siendo influenciada por limitaciones del estudio como lo es el pequeño número de casos y los diferentes puntos de vista para determinar la edad de inicio de la HD. Asimismo, es probable que con más datos y más familias analizadas quizás se aprecie la tendencia indicada.

En la HD la correlación clínica entre el tamaño de la expansión y la edad de inicio tan solo es significativa para mutaciones con más de 70 repeticiones CAG, pero como la mayoría de los pacientes estudiados a nivel mundial (90%) presentan entre 40 y 55 repeticiones, en nuestro estudio entre 42 y 55, raramente se observa el fenómeno de anticipación (Fernandes 2001).

El incremento en la longitud de las tripletas CAG entre padres e hijos(as) en algunas familias provee la base molecular para el fenómeno de anticipación, que se explica por la inestabilidad en la vía germinal que exhiben las repeticiones CAG expandidas y en la HD se produce, por lo general, cuando la transmisión de la mutación es por vía paterna (Myers *et al.* 1999a). En nuestro caso, mediante el diagnóstico molecular, se vió que en 3 de las transmisiones intergeneracionales (2 vía paterna y 1 vía materna) un progenitor(a) afectado(a) heredó a su hijo(a) un alelo mutado expandido. Por el momento estos hijos(as) permanecen asintomáticos(as), lo cual no es extraño pues sus edades son inferiores a los 38 años y por lo general la HD se presenta entre los 30 y los 50 años. A pesar de que ninguno ha alcanzado ni sobrepasado la edad de inicio de la HD en sus respectivos progenitores, es posible que en estos casos no se observe una clara anticipación, ya que el incremento en el número de repeticiones es pequeño.

Muchos estudios han mostrado que hay una gran variabilidad en la edad de inicio de la HD en diferentes familias, incluso entre individuos con idéntica longitud de repeticiones en el gen *HD*, como el caso reportado en este estudio (paciente III.7 de la familia #1 y la III.14 de la familia #3) y han demostrado que esta variabilidad es atribuible a modificadores genéticos y ambientales que actúan en conjunto con el gen de la HD (Wexler *et al.* 2004). Este caso no solamente demuestra el pobre poder predictivo

para la edad de inicio que tiene el número de repeticiones CAG sino también la variación sustancial en la edad de inicio que no es explicada por el tamaño de la mutación.

Estudios de gemelos monocigóticos, han mostrado claramente, por la alta concordancia en la edad de inicio, que los factores genéticos tienen un papel significativo (Andrew *et al.* 1993). Se estima, según diferentes estudios, que la cantidad de repeticiones CAG en el alelo mutado explica entre el 50-77% de la variación en la edad de inicio en diferentes poblaciones (Bates 2005). En nuestro caso, el 83% de la variación en la edad de inicio de la HD en las familias de CR, se debe al tamaño de la repetición en el gen de la HD.

Un reciente estudio en Venezuela muestra que el 59% de la variabilidad residual en la edad de inicio puede ser atribuida a factores genéticos o factores ambientales compartidos (Wexler *et al.* 2004).

En otro estudio se encontró que un polimorfismo (repetición TAA) en la región 3'UTR del gen que codifica para la subunidad 6 receptor ionotrópico kainato (*GLUR6*) explicaba el 13% de la variancia en la edad de inicio, que no era explicada por las repeticiones CAG expandidas (Rubinsztein *et al.* 1997). El receptor kainato puede mediar la excitotoxicidad en el cerebro y por lo tanto variaciones en el gen pueden llevar a una actividad alterada, aumentando o disminuyendo el riesgo de daño excitotóxico, subsecuente al daño causado por la expansión de poliglutamina. Alteraciones en el gen que codifica para la subunidad 6 del receptor ionotrópico kainato (*GLUR6*) han sido asociadas con edades de inicio menores (MacDonald *et al.* 1999).

Se ha sugerido también que otros genes sobre el cromosoma 4 podrían estar interactuando con el gen *HD* para modificar la edad de inicio de la enfermedad. Li *et al.* (2003), en un reciente escaneo del genoma para buscar modificadores de la edad de inicio en la HD sugieren que podría haber genes modificadores en la región 4p16 (LOD=1.93), 6p21-23 (LOD=2.29) y 6q24-26 (LOD=2.28).

En un estudio realizado por Djoussé *et al.* (2004) se evaluó si la edad de inicio era influenciada por algunos marcadores (MSX1, Δ 2642 y BJ56) en la región 4p16 y se vió una asociación entre los alelos MSX1 y la edad de inicio, después de realizar los ajustes necesarios. Para los otros 2 marcadores no se encontró ninguna asociación.

La identificación de los factores modificadores, especialmente aquellos que llevan a posponer la edad de inicio mucho más tarde en la vida y a prolongar los años productivos, es algo que podría llegar a ser muy ventajoso en la búsqueda y desarrollo

de nuevos agentes terapéuticos que puedan estar disponibles y accesibles a todos (Wexler *et al.* 2004).

Otros estudios han mostrado que las repeticiones CAG en el alelo normal interactúan con las repeticiones CAG expandidas e influyen sobre la edad de inicio de la HD. Djoussé *et al.* (2003), también encontraron que el número de repeticiones en el alelo normal influye en la edad de inicio. Aunque el efecto es pequeño y explica el 1% de la variación en la edad de inicio, es significativo que, en contraste con las repeticiones CAG por sí mismas en el alelo mutado, un incremento en el número de repeticiones en los alelos normales está asociado con un inicio tardío de la HD en personas con expansiones grandes de repeticiones CAG. Sin embargo, en nuestro caso no se encontraron expansiones grandes, por lo tanto, no se pudo apreciar este efecto.

Estudios previos han reportado que la huntingtina normal puede reducir la toxicidad celular y proteger contra la muerte celular (Rigamonti *et al.* 2000 y Leavitt *et al.* 2001). También hay indicaciones de que la poliglutamina expandida puede unirse físicamente con la poliglutamina normal (Boutell *et al.* 1999 y Kazantsev *et al.* 1999). Una interacción entre la proteína normal y la proteína patológica puede llevar a una mitigación de los efectos de la huntingtina mutante, retrasando, por lo tanto, la edad de inicio de la HD (Di Prospero y Tagle 2000).

Según Kehoe *et al.* (1999), la proporción entre el número de repeticiones CAG en el alelo normal y el número de repeticiones en el alelo mutado, puede ser tan importante para la edad de inicio como la longitud de las repeticiones en el alelo normal por sí misma, y entre más grande sea la disparidad entre las dos longitudes de repeticiones, la edad de inicio es más temprana en pacientes mujeres con la HD heredada paternalmente. En el presente estudio se tiene solo un caso de una mujer con la HD heredada vía paterna, (Fig. 5, III.2) por lo tanto al no contar con más datos no se puede analizar esta correlación.

Existe fuerte evidencia de que la traducción de la proteína HTT es requisito para el desarrollo de la patología de la HD (Nasir *et al.* 1996) y las inclusiones inmunorreactivas a la HTT, han sido encontradas tanto en ratones transgénicos para el exón 1 del gen *HD* con repeticiones expandidas así como en el cerebro de pacientes con la HD (Martín-Aparicio y Lucas 2002).

La HTT interactúa con moléculas como la HAP1 y la GAPDH de una manera dependiente de la longitud del tracto de poliglutamina, por lo cual, entre mayor el número de repeticiones CAG, la unión a estas proteínas es más fuerte (Li *et al.* 1995 y

Burke 1996). Si el fenotipo de la enfermedad resulta de una afinidad de unión mayor, previniendo la liberación de proteínas que interactúan a partir de cualquier complejo formado con los tractos de poliglutamina expandidos patológicos, entonces, un tracto de poliglutamina normal más largo (o sea, la proporción entre repeticiones CAG expandidas y normales es más pequeña) puede competir mejor con la proteína expandida, permitiendo mucho menos interacciones aberrantes y por lo tanto retrasando la edad de inicio (Kehoe *et al.* 1999). La especificidad en el sexo, como menciona Kehoe *et al.* (1999), puede reflejar diferencias de género en la disponibilidad de varias proteínas para la interacción. Alternativamente, un gen modificador con impronta, en desequilibrio de ligamiento con la HD, podría conducir o modular la interacción.

Hay varios aspectos aún desconocidos acerca de la HD. Muchos de ellos están en debate entre la comunidad científica de todo el mundo, como son: el mecanismo responsable de la expansión y la vía que lleva a la neurodegeneración. Antes de buscar la manera de atacar la HD se requiere primero conocer con exactitud cuáles son las funciones fisiológicas y bioquímicas de la HTT para así poder entender cómo es que la proteína anormal provoca los daños. Una vez que se logre esto, lo ideal sería atacar la HD desde su base, ya sea intentando corregir el gen defectuoso o bien neutralizando sus efectos de un modo muy específico.

Los datos obtenidos en este primer estudio de la HD en Costa Rica coinciden con los hallazgos en otras partes del mundo, es decir, la mutación que causa la HD en las familias costarricenses tiene el mismo comportamiento con respecto a su transmisión. Por lo incapacitante de la enfermedad, es muy importante seguir realizando estos estudios, así como estudiar la epidemiología de este tipo de enfermedades en Costa Rica. Los mejores tratamientos van a resultar de la más completa información disponible y esto contribuirá a un mejor manejo de los pacientes y sus familiares.

La posibilidad de conocer el diagnóstico definitivo de la HD y de interpretar estos resultados junto a la historia clínica del paciente, las exploraciones radiológicas y estudios de laboratorio, es una valiosísima fuente de información para profundizar en el conocimiento de este tipo de enfermedades.

Conclusiones y recomendaciones

- 1- Los objetivos propuestos en esta investigación se cumplieron.
- 2- El diagnóstico molecular de la HD es ahora posible en Costa Rica y se espera que contribuya al diagnóstico correcto de pacientes en los cuales el diagnóstico clínico es incierto.
- 3- El método de tinción con nitrato de plata ofrece resultados apropiados sin necesidad de hacer uso de métodos radiactivos.
- 4- Hemos identificado las primeras familias portadoras de HD en nuestro país.
- 5- Una de las aplicaciones fundamentales del análisis de la expansión CAG en la enfermedad de Huntington es el diagnóstico presintomático, que ofrece una herramienta de primer orden para el manejo clínico y consejo genético de los pacientes y de las familias, así como una oportunidad a las personas en riesgo.
- 6- El diagnóstico molecular provee más detalles clínicos, patológicos e información molecular que ayudará a mejorar nuestro entendimiento de este trastorno.
- 7- El diagnóstico preciso de la mutación inestable asociada a la HD permitió detectar sin ambigüedad a las personas clínicamente afectadas y a las positivas asintomáticas.
- 8- Nuestros análisis moleculares han mostrado un perfil del número de repeticiones CAG similar a los reportados en otras poblaciones a nivel mundial.
- 9- Hay una tendencia hacia la expansión o contracción de las repeticiones, determinada por el sexo del progenitor que está transmitiendo la enfermedad.
- 10- Se comprobó que la longitud de las repeticiones expandidas CAG muestra una correlación negativa con la edad de inicio de la HD.
- 11- Contar con la participación de especialistas en el campo de la psicología nos permitió una mejor comprensión de las causas psicológicas y sociales que afectan a individuos portadores y familiares de esta condición médica.
- 12- La presente investigación hizo una contribución importante al desarrollo de la medicina costarricense, permitiendo dar a los pacientes con la enfermedad de Huntington y sus familias consejo genético oportuno y adecuado basado en información objetiva y confiable.
- 13- Se logró llenar un gran vacío en cuánto a información sobre la enfermedad, especialmente aclarando las dudas que tenían los miembros de las familias afectadas en relación con el patrón de herencia y los riesgos de transmisión.

- 14- Un mayor número de casos analizados en el futuro, podrían confirmar las observaciones y los datos presentados aquí, ya que son los primeros obtenidos en el país.
- 15- Por lo incapacitante de la enfermedad, es muy importante realizar futuros estudios, no solo a nivel genético sino también a nivel clínico, involucrando neurólogos de los hospitales nacionales, lo cual permitiría un mejor manejo de los pacientes y sus familiares.
- 16- La posibilidad de conocer el diagnóstico definitivo de la HD y de interpretar estos resultados junto a la historia clínica del paciente, las exploraciones radiológicas y estudios de laboratorio, es una valiosísima fuente de información para profundizar en el conocimiento de este tipo de enfermedades.
- 17- Es importante dar a conocer los resultados de este estudio y divulgar conocimientos sobre la HD, no solo a los clínicos sino a toda la sociedad con el fin de llenar el vacío que hay en cuanto a información sobre la enfermedad.
- 18- No solo es importante educar a la población con respecto a la enfermedad, sino también sería sumamente valioso tener el apoyo institucional de la Universidad de Costa Rica para contar con un centro interdisciplinario de atención integral para este tipo de familias, en especial poder ofrecerles sistemas de consultas neuropsicológicas constantes.

BIBLIOGRAFIA

- Akbas, F. & N. Erginel-Unaltuna. 2003. DNA testing for Huntington disease in the Turkish population. *European Neurology* 50(1): 20-4.
- Alonso, M.E., P. Yescas, B. Cisneros, C. Martínez, G. Silva, A. Ochoa & C. Montañez. 1997. Analysis of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in a Mexican population. *Clin. Genet.* 51: 225-230.
- Andrew, S.E., Y.P. Goldberg, B. Kremer, H. Telenius, J. Theilmann, S. Adam, E. Starr, F. Squitieri, B. Lin, M.A. Kalchman, R.K. Graham & M.R. Hayden. 1993. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4: 398-403.
- Andrew, S.E., Y.P. Goldberg, J. Theilmann, J. Zeisler & M.R. Hayden. 1994. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive power. *Hum. Mol. Genet.* 3: 65-8.
- Anónimo. The Huntington's Disease Research Collaborative Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983.
- Anónimo. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. 1998. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1243-1247.
- Bates, G.P. 2005. History of genetics disease: The molecular genetics of Huntington disease-a history. *Nat. Rev. Genet.* 6(10): 766-73.
- Boutell, J.M., P. Thomas, J.W. Neal, V.J. Weston, J. Duce, P.S. Harper & A.L. Jones. 1999. Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1647-1655.
- Burke, J.R., J.J. Enghild, M.E. Martin, Y.S. Jou, R.M. Myers, A.D. Roses, J.M. Vance & W.J. Strittmatter. 1996. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat. Med.* 2(3): 347-350.
- Cannella, M., C. Gellera, V. Maglione, P. Giallonardo, G. Cislighi, M. Muglia, A. Quattrone, F. Pierelli, S. Di donato & F. Squitieri. 2004. The gender effect in

- juvenile Huntington disease patients of Italian origin. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 125(1): 92-98.
- Cattaneo, E., D. Rigamonti & C. Zuccato. 2003. Enfermedad de Huntington. *Investigación y Ciencia* 317: 26-31.
- Chong, S.S., E. Almqvist, H. Telenius, L. LaTray, K. Nichol, B. Bourdelat-Parks, Y.P. Goldberg, B.R. Haddad, F. Richards, D. Sillence, C.R. Greenberg, E. Ives, G. Van den Engh, M.R. Hughes & M.R. Hayden. 1997. Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analysis. *Hum. Mol. Genet* 6: 301-309.
- Cleary, J.D. & C.E. Pearson. 2003. The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet. Genome. Res.* 100: 25-55.
- Cuenca, P. & F. Morales. 1999. Mutaciones Inestables: causa de algunas enfermedades neurológicas hereditarias. *Acta Médica Costarricense* 41(2): 7-15.
- Di Prospero, N. A. & D.A. Tagle. 2000. Normal and mutant huntingtin: Partners in crime. *Nat. Med* 6: 1208-1209.
- Djousse, L., B. Knowlton, M.R. Hayden, E.W. Almqvist, R.R. Brinkman, C.A. Ross, R.L. Margolis, A. Rosenblatt, A. Durr, C. Dode, P.J. Morrison, A. Novelletto, M. Frontali, R.J.A. Trent, E. McCusker, E. Gómez-Tortosa, D. Mayo, R. Jones, A. Zanko, M. Nance, R.K. Abramson, O. Suchowersky, J.S. Paulsen, M. B. Harrison, Q. Yang, L.A. Cupples, J.F. Gusella, M.E. MacDonald & R.H. Myers. 2003. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am. J. Med. Genet. A.* 119: 279-282.
- Djousse, L., B. Knowlton, M.R. Hayden, E.W. Almqvist, R.R. Brinkman, C.A. Ross, R.L. Margolis, A. Rosenblatt, A. Durr, C. Dode, P.J. Morrison, A. Novelletto, M. Frontali, R.J.A. Trent, E. McCusker, E. Gómez-Tortosa, D. Mayo, R. Jones, A. Zanko, M. Nance, R.K. Abramson, O. Suchowersky, J.S. Paulsen, M. B. Harrison, Q. Yang, L.A. Cupples, J. Mysore, J.F. Gusella, M.E. MacDonald & R.H. Myers. 2004. Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16. *Neurogenetics* 5: 109-114.
- Doble, A. 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* 81(3): 163-221.

- Duyao, M., C. Ambrose, R. Myers, A. Novelletto, F. Persichetti, M. Frontali, S. Folstein, C. Ross, M. Franz, M. Abbott, J. Gray, P. Conneally, A. Young, J. Penney, Z. Hollingsworth, I. Shoulson, A. Lazzarini, A. Falek, W. Koroshetz, D. Sax, E. Bird, J. Vonsattel, E. Bonilla, J. Alvir, J. Bickham, J. H. Cha, L. Dure, F. Gomez, M. Ramos, J. Sanchez-Ramos, S. Snodgrass, M. de Young, N. Wexler, C. Moscowitz, G. Penchaszadeh, H. MacFarlane, M. Anderson, B. Jenkins, J. Srinidhi, G. Barnes, J. Gusella & M. MacDonald. 1993. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4(4): 387-92.
- Engelender, S., A.H. Sharp, V. Colomer, M.K. Tokito, A. Lanahan, P. Worley, E. Holzbaur & C.A. Ross. 1997. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum. Mol. Genet.* 6: 2205-2212.
- Evers-Kiebooms, G., K. Nys, P. Harper, M. Zoetewij, A. Dürr, G. Jacopini, C. Yapijakis & S. Simpson. 2002. Predictive DNA-testing for Huntington's disease and reproductive decision making: a European collaborative study. *Nature* 10(3): 167-176.
- Fernandes, J. 2001. La Enfermedad de Huntington: una visión biomolecular. *Rev. Neurología* 32(8): 762-767.
- Goldberg, Y.P., C.T. McMurray, J. Zeisler, E. Almqvist, D. Sillence, F. Richards, A.M., Gacy, J. Buchanan, H. Telenius & M.R. Hayden. 1995. Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. *Hum. Mol. Genet.* 4: 1911-18.
- Gordenin, D.A., T.A. Kunkel & M.A. Resnick. 1997. Repeat expansion-all in a flap? *Nature Genet.* 16: 116-118.
- Greenamyre, J. & R. Porter. 1994. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurol.* 44: s7-s13.
- Guízar, J.J. 1994. Clasificación de la patología genética, pp. 155-157. *In* J.J. Avila (ed.). *Genética Clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. El Manual Moderno S. A., México.
- Gusella, J.F., N.S. Wexler, P.M. Conneally, S.L. Naylor, M.A. Anderson, R.E. Tanzi, P.C. Watkins, K. Ottina, M.R. Wallace, A.Y. Sakaguchi, A.B. Young, I. Shoulson, E. Bonilla & J.B. Martín. 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306: 234-238.

- Gusella, J. & A.B. Young. 1993. Huntington's Disease, pp. 113-127. *In* M. Conneally (ed.). *Molecular Basis of Neurology*. Blackwell Scientific Publications, Boston. Gutekunst, C.A., A.I. Levey, C.J. Heilman, W.L. Whaley, H. Yi, N.R. Nash, H.D. Rees, J.J. Madden & S.M. Hersch. 1995. Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 8710-8714.
- Harper, P.S. 1992. The epidemiology of Huntington's disease. *Hum. Genet.* 89: 365-376.
- Hayden, M.R. 1981. *Huntington Chorea*. Springer-Verlag, New York. 192p.
- Hayden, M.R. 2000. Huntington's disease. pp. 265-280. *In* S. Pulst (ed.). *Neurogenetics*. Oxford University, Inglaterra.
- Jakupciak, J. & D.R. Wells. 1999. Genetics instabilities in (CTG.CAG) repeats occur by recombination. *J. Biol. Chem.* 274(33): 23468-23479.
- Jones, A.L., J.D. Wood & P.S. Harper. 1997. Huntington disease: Advances in molecular and cell biology. *J. Inher. Dis.* 20: 125-138.
- Kazantsev A., E. Preisinger, A. Dranovsky, D. Goldgaber & D. Housman. 1999. Insoluble detergent resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11404-11409.
- Kehoe, P., M. Krawczak, P.S. Harper, M.J. Owen & A.L. Jones. 1999. Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. *J. Med. Genet.* 36: 108-111.
- Kennedy, L. E. Evans, C-M. Chen, L. Craven, P. J. Detloff, M. Ennis & P.F. Shelbourne. 2003. Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 12(24): 3359-3367.
- Kremer, B. 2002. Clinical neurology of Huntington's disease, pp. 43-53. *In* G. Bates, P. Harper & L. Jones (eds.). *Huntington's disease*. Oxford University Press, New York.
- Kremer, B., E. Almqvist, J. Theilmann, N. Spence, H. Telenius, Y.P. Goldberg & M.R. Hayden. 1995. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 57(2): 343-350.

- Laccone, F. & W. Christian. 2000. A recurrent expansion of a maternal allele with 36 CAG repeats causes Huntington Disease in two sisters. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1145-1148.
- Lahue, R.S & D.L. Slater. 2003. DNA repair and trinucleotide repeat instability. *Front. Biosci.* 8: 653-65.
- Leavitt, B.R., J.A. Guttman, J.G. Hodgson, G.H. Kimel, R. Singaraja, A.W. Vogl & M.R. Hayden. 2001. Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 313-324.
- Leeflang, E.P., L. Zhang, S. Tavaré, R. Hubert, J. Srinidhi, M.E. MacDonald, R.H. Myers, M.D. Young, M.S. Wexler, J.F. Gusella & N. Arnheim. 1995. Single sperm analysis of the trinucleotide repeats in the Huntington's disease gene: quantification of the mutation frequency spectrum. *Hum. Mol. Genet.* 4: 1519-1526.
- Li, J.L., M.R. Hayden, E.W. Almqvist, R.R. Brinkman, A. Durr, C. Dode, P.J. Morrison, O. Suchowersky, C.A. Ross, R.L. Margolis, A. Rosenblatt, E. Gómez-Tortosa, E.M. Cabrero, A. Novelletto, M. Frontali, M. Nance, R.J.A. Trent, E. McCusker, R. Jones, J.S. Paulsen, M. Harrison, A. Zanko, R.K. Abramson, A.L. Russ, B. Knowlton, L. Djoussé, J.S. Mysore, S. Tariot, M.F. Gusella, V.C. Wheeler, L.D. Atwood, L.A. Cupples, M. Saint-Hilaire, J-H.J. Cha, S.M. Hersch, W.J. Koroshetz, J.F. Gusella, M.E. MacDonald & R.H. Myers. 2003. A genome scan for modifiers of age onset in Huntington disease: The HD MAPS study. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 682-687.
- Li, S.H. & X.J. Li. 1998. Aggregation of the N-terminus of huntingtin depends on its length of glutamine repeat. *Hum. Mol. Genet.* 7: 777-782.
- Li, X.J., S.H. Li, A.H. Sharp, C.F. Nucifora, G. Schilling, A. Lanahan, P. Worley, S.H. Snyder & C.A. Ross. 1995. A huntingtin associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378: 398-402.
- Li, X.J. 1999. The Early Cellular Pathology of Huntington's Disease. *Mol. Neurobiol.* 20: 111-124.
- Lima e Silva, T., H. Guerra, C. Bertuzzo, & I. Lopes. 2000. Molecular diagnosis of Huntington disease in Brazilian patients. *Arq. Neuropsiquiatr.* 58(1): 11-17.
- Lipton, S. & P. Rosenberg. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl. J. Med.* 330: 613-22.

- MacDonald, M.E., G. Barnes, J. Srinidhi, M.P. Duyao, C.M. Ambrose, R.H. Myers, J. Gray, P.M. Coneally, A. Young, J. Penney, I. Shoulson, Z. Hollingsworth, W. Koroshetz, E. Bird, J.P. Vonsattel, E. Bonilla, C. Moskowitz, G. Penschaszadeh, L. Brzustowicz, J. Alvir, J. Bickham Conde, J-H. Cha, L. Dure, F. Gomez, M. Ramos-Arroyo, J. Sanchez-Ramos, S.R. Snodgrass, M. de Young, N.S. Wexler, H. MacFarlane, M.A. Anderson, B. Jenkis. & J.F. Gusella. 1993. Gametic but no somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease. *J. Med. Genet.* 30: 982-986.
- MacDonald, M.E., J.P. Vonsattel, J. Shrinidhi, N.N. Couropmitree, L.A. Cupples, E.D. Bird, J.F. Gusella & R.H. Myers. 1999. Evidence for the GLUR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* 53: 1330-1332.
- Martin, J.B. 1999. Molecular Basis of the Neurodegenerative Disorders. *N. Engl. J. Med.* 25(340): 1970-80.
- Martín-Aparicio, E. & J.J. Lucas. 2002. Bases moleculares de la enfermedad de Huntington y posibles mecanismos patogénicos. *Rev. Neurol.* 35(3): 212-220.
- Martínez, A. & A. Rábano. 2002. Anatomía patológica de la enfermedad de Huntington. *Rev. Esp. Patol.* 35(4): 517-528.
- McNeil, S.M., A. Novelletto, J. Srinidhi, G. Barnes, I. Kornbluth, M.R. Altherr, J.J. Wasmuth, J.F. Gusella, M.E. MacDonald & R.H. Myers. 1997. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Hum. Mol. Genet.* 6(5): 775-779.
- Morera, B., R. Barrantes & R. Marín-Rojas. 2003. Gene Admixture in the Costa Rican Population. *Annals of Human Genetics* 67: 71-80.
- Myers, R.H., L.A. Cupples, M. Schoenfeld, R.B. D'Agostino, N.C. Terrin, N. Goldmarkher & P.A. Wolf. 1985. Maternal factor in onset of Huntington's disease. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 125-130.
- Myers, R.H., J.P. Vonsattel, T.J. Stevens, L.A. Cupples, E.P. Richardson, J.B. Martin & E.D. Bird. 1988. Clinical and Neuropathological assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38: 341-347.
- Myers, R.H., K.S. Marans & M.E. MacDonald. 1999a. Huntington's disease, pp. 301-323. *In* R.D. Wells & S.T. Warren (eds.). *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. Academic, California, USA.

- Myers, R.H., K.S. Marans & M.E. MacDonald. 1999b. Molecular Pathogenesis of Huntington's disease: Biochemical Studies of Huntingtin, pp. 325-354. *In* R.D. Wells & S.T. Warren (eds.). Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases. Academic, California, USA.
- Myers, R.H. 2004. Huntington's disease genetics. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1: 255-262.
- Nahas, F.A., J. Garbern, K.M. Krajewski, B.B. Roa & G.L. Feldman. 2005. Juvenile onset Huntington Disease resulting from a very large maternal expansion. *Am. J. Med.Genet.* 137A: 328-331.
- Nance, M.A., V. Mathias-Hagen, G. Breningstall, M.J. Wick & R.C. McGlennen. 1999. Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* 52: 392-394.
- Nasir, J., Y.P. Goldberg & M.R. Hayden. 1996. Huntington disease: new insights into the relationship between CAG expansion and disease. *Hum. Mol. Genet.* 5: 1431-1435.
- Parniewski, P. & P. Staczek. 2002. Molecular mechanisms of TRS instability *Adv. Exp. Med. Biol.* 516: 1-25.
- Pearson, E.C. & R.R. Sinden. 1996. Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci. *Biochemistry* 35: 5041-5053.
- Petersén, A., K. Mani & P. Brundin. 1999. Recent Advances on the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Experimental Neurology* 157: 1-18.
- Petruska, J., M. Harstentine & M. Goodman. 1998. Analysis of strand in DNA polymerase expansions of CAG/CTG triplet repeats associated with neurodegenerative disease. *J. Biol. Chem.* 273(9): 5204-5210.
- Potter, N.T., E.B. Spector & T.W. Prior. 2004. Technical Standards and Guidelines for Huntington Disease Testing. *Genetics in Medicine* 6 (1): 61-65.
- Ramos-Arroyo, M.A., S. Moreno & A. Valiente. 2005. Incidence and mutation rates of Huntington's disease in Spain: experience of 9 years of direct genetic testing. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76: 337-342.
- Reddy, P.S. & D.E. Housman. 1997. The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 364-372.
- Richards, R.I. 2001. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum. Mol. Genet.* 10(20): 2187-2194.

- Richards, R.I. & G.R. Sutherland. 1997. Dynamic mutation : possible mechanisms and significance in human disease. *Trends Biochem. Sci.* 22: 432-436.
- Rigamonti, D., J.H. Bauer, C. De-Fraja, L. Conti, S. Sipione, C. Sciorati, E. Clementi, A. Hackam, M.R. Hayden, Y. Li, J.K. Cooper, C.A. Ross, S. Govoni, C. Vincenz & E. Cattaneo. 2000. Wildtype huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J. Neurosci.* 20: 3705-3713.
- Rubinsztein, D.C., D.E. Barton, B.C.C. Davison & M.A. Ferguson-Smith. 1993. Analysis of the huntington gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1713-1715.
- Rubinsztein, D.C., J. Leggo, M. Chiano, A. Dodge, G. Norbury, E. Rosser & D. Craufurd. 1997. Genotypes at the GLUR6 Kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3872-3876.
- Saleem, Q., S. Roy, U. Murgood, R. Saxena, I.C. Verma, A. Anand, U. Muthane, S. Jain & S.K. Brahmachari. 2003. Molecular analysis of Huntington's disease and linked polymorphisms in the Indian population. *Acta Neurol. Scand.* 108: 281-286.
- Sánchez, A., S. Castellvi-Bel, M. Mila, D. Genis, M. Calopa, D. Jiménez & X. Estivill. 1996. Huntington's disease: confirmation of diagnosis and presymptomatic testing in spanish families by genetic analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 61(6): 625-7.
- Sánchez, A., M. Mila, S. Castellvi-Bel, M. Rosich, D. Jiménez, C. Badenas & X. Estivill. 1997. Maternal transmission in sporadic Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62(5): 535-7.
- Sato, T., M. Oyake, K. Nakamura, K. Nakao, Y. Fukusima, O. Onodera, S. Igarashi, H. Takano, K. Kikugawa, Y. Ishida, T. Shimohata, R. Koide, T. Ikeuchi, H. Tanaka, N. Futamura, R. Matsumura, T. Takayanagi, F. Tanaka, G. Sobue, O. Komure, M. Takahashi, A. Sano, Y. Ichikawa, J. Goto, I. Kanazawa, M. Katsuki, S. Tsuji. 1999. Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients. *Hum. Mol. Genet.* 8: 99-106.

- Schilling, G., A. Sharp, S. Loev, M. Wagster, S. Hua-Li, O. Colin & C. Ross. 1995. Expression of the Huntington's disease (IT15) protein product in HD patients. *Hum. Mol. Genet.* 4(8): 1365-1371.
- Seneca, S., D. Fagnart, K. Keymolen, W. Lissens, D. Hasserts, S. Debulpaep, B. Desprechins, I. Liebaers & L. De Meirleir. 2004. Early onset Huntington disease: A neuronal degeneration syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 163: 717-721.
- Sinden R., V. Potaman, E. Oussatcheva, C. Pearson, Y. Lyubchenko & L. Shlyakhtenko. 2002. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. *J. Biosci.* 27(1): 53-65.
- Solís, M.P., J.A. Burguera, F. Palau, L. Livianos, M. Vila & L. Rojo. 2001. Resultados de un programa de diagnóstico presintomático en la enfermedad de Huntington: evaluación de un período de 6 años. *Neurología* 16(08): 348-352.
- Steffan, J.S., A. Kazantsev, O. Spasic-Boskovic, M. Greenwald, Y.Z. Zhu, H. Gohler, E.E. Wanker, G.P. Bates, D.E. Housman & L.M. Thompson. 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(12): 6763-6768.
- Straus, W.M. 1988. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue, pp. 2.2.1-2.2.3. *In* F.M. Ausubel, R. Brent & R.E. Kingston (eds.). *Current protocols in molecular biology*. Wiley, New York.
- Sugars, K.L. & D.C. Rubinsztein. 2003. Transcriptional abnormalities in Huntington Disease. *Trends in Genetics* 19(5): 233-238.
- Telenius, H., H.P. Kremer, J. Theilmann, S.E. Andrew, E. Almqvist, M. Anvret, C. Greenberg, J. Greenberg, G. Lucotte, F. Squitieri, E. Starr, Y.P. Goldberg & M.R. Hayden. 1993. Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1535-1540.
- Telenius, H., E. Almqvist, B. Kremer, N. Spencer, F. Squitieri, K. Nichol, U. Grandell, E. Starr, C. Benjamin & I. Castaldo. 1995. Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)_n changes in Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 4: 189-195.
- Vonsattel, J.P., R.H. Myers, T.J. Stevens, R.J. Ferrante, E.D. Bird & E.P. Richardson. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44: 559-577.

- Vuillaume, I., P. Vermersch, A. Destée, H. Petit & B. Sablonnière. 1998. Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64: 758-762.
- Wallerstein, C. 2000. Huntington's centre faces closure. *B.M.J.* 321(7258): 404.
- Warner, J.P. L. H. Barron, D.J.H. Brock. 1993. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosome. *Mol. Cell Probes* 7: 235-239.
- Wexler, N. & The U.S.–Venezuela Collaborative Research Project. 2004. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(10): 498-3503.
- Wheeler, C., W. Auerbach, J.K. White, J. Srinidh, A. Auerbach, A. Ryan, M.P. Duyao, V. Vrbanac, M. Weaver, J.F. Gusella, A.L. Joyner & M.E. MacDonald. 1999. Length dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum. Mol. Genet.* 8(1): 115-122.
- Whitefield, J.E., L. Williams, K. Snow, J. Dixon, I. Winship, P.M. Stapleton, R.M. Faull & D.R. Love. 1996. Molecular analysis of the Huntington's disease gene in New Zealand. *New Zealand Medical Journal* 109(1015): 27-30.
- Xia, J., D. Lee, J. Taylor, M. Vandelft & R. Truant. 2003. Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum. Mol. Genet.* 12(12): 1393.
- Young, A.B. 1998. Huntington's disease and other trinucleotide repeat disorders, pp. 35-54. *In* J.B. Martin (ed.). *Molecular neurology*. Scientific American, New York.
- Zuccato, C., M. Tartari, A. Crotti, D. Goffredo, M. Valenza, L. Conti, T. Cataudella, B. Leavitt, M.R. Hayden, T. Timmusk, D. Rigamonti & E. Cattaneo. 2003. Huntingtin interacts with REST / NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genetics* 35: 76-83.

APENDICE I:

FORMULARIOS

Universidad de Costa Rica

Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)

Fórmula de consentimiento informado

“Estudio Genético-Molecular y Neuropsicológico de la Enfermedad de Huntington”

Nombre del Investigador Principal: Patricia Cuenca Berger, Ph.D.

Nombre del Participante:

A. PROPÓSITO DEL ESTUDIO

La Enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad que va deteriorando el cerebro con el paso del tiempo. Las células nerviosas van degenerándose y finalmente mueren. Es una enfermedad en la que los síntomas van manifestándose poco a poco hasta convertirse en problemas muy severos después de unos años. Los pacientes presentan movimientos rápidos e involuntarios de los músculos de la cara, brazos, piernas y tronco. Conforme avanza la enfermedad presentan movimientos anormales lentos, posturas anormales y los movimientos involuntarios pueden disminuir. Puede haber una disminución de la memoria reciente y además se reduce la habilidad para organizar asuntos o poder ocuparse eficazmente de situaciones nuevas. También pueden presentarse cambios emocionales o de personalidad, como cambios de humor, tristeza, apatía y comportamiento agresivo. Por lo general, la mayoría de los pacientes comienzan a enfermarse entre los 30 y 40 años de edad. Aunque ocasionalmente (10%), pueden enfermarse antes de los 20 años de edad (HD juvenil) con síntomas más severos.

Esta enfermedad se hereda de padres a hijos. El defecto que la causa consiste en un aumento del tamaño de un segmento del material genético, o sea en la sustancia responsable de la herencia. Este segmento tiene un tamaño definido en las personas sanas, pero en pacientes afectados con esta enfermedad, su tamaño es mucho mayor. Pacientes con tamaños pequeños presentan síntomas leves, pero pacientes con tamaños grandes, presentan síntomas más severos. Además, en la familias afectadas por la

enfermedad de Huntington, el segmento cambia de tamaño, o sea es inestable, con la transmisión de padres a hijos. En su familia hay al menos una persona que por sus características clínicas nos hace sospechar que podría padecer de esta enfermedad. Estas sospechas deben confirmarse por exámenes moleculares debido a las razones que se explicarán a continuación. Para realizar estos exámenes solicitamos su autorización. Si el diagnóstico se confirma, es importante que otros miembros de su familia también sean estudiados, porque esta enfermedad es hereditaria y tiene algunas características que la hacen diferente a otras enfermedades genéticas.

En este sentido, en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica se está llevando a cabo un estudio con el fin de ofrecer a las familias afectadas por la enfermedad en el país, información sobre la herencia de la enfermedad genética basada en el diagnóstico preciso del problema molecular. Los investigadores del Proyecto, quienes están llevando a cabo el estudio son: la bióloga Melissa Vásquez Cerdas, la Dra. Patricia Cuenca Berger y el M.Sc. Fernando Morales Montero del INISA, el Dr. Gerardo del Valle Carazo de NeuroLab, el Dr. Hubert Fernández Morales del Hospital Calderón Guardia, el Dr. Mauricio Sittenfeld Appel del Servicio de Neurología del Hospital San Juan de Dios, el Dr. Domingo Campos del Instituto de Investigaciones Psicológicas y el Dr. Benicio Gutiérrez Doña de la Universidad Nacional Estatal a Distancia (UNED).

B. ¿QUÉ SE HARÁ?

Si acepto participar en este estudio, se realizará:

- 1- Una entrevista a un miembro de la familia con el fin de obtener los antecedentes familiares.
- 2- La toma de una muestra de sangre con el fin de poder llevar a cabo el estudio molecular.
- 3- Un examen físico que llevará a cabo uno de los neurólogos participantes en la investigación.
- 4- Se administrarán pruebas psicológicas en cuatro distintos momentos del estudio:
 - a) línea base (durante la primera reunión antes de brindar el diagnóstico molecular), b) una semana posterior a la comunicación del diagnóstico, c) 6 meses después, d) un año después de brindado el diagnóstico. La batería

completa de pruebas será administrada en una sesión en cada uno de los cuatro distintos momentos de evaluación

C. RIESGOS

Este estudio no implica ninguna aplicación de técnicas que pongan en riesgo la integridad física o psicológica de las personas

1- La participación en este estudio puede significar cierto riesgo o molestia para mí por lo siguiente:

a- En la toma de la muestra de la sangre el único riesgo es que después de tomada la muestra, puede quedar un morete sin ninguna consecuencia.

b- En la aplicación de las pruebas psicológicas el único riesgo posible es la sensación de incomodidad que pueden sentir algunas personas al hacerseles preguntas o tratar temas con aspectos de corte personal.

2- No hay posibilidad de sufrir daño alguno como consecuencia de los procedimientos a los que será sometida la persona que desee participar.

D. BENEFICIOS

Con el desarrollo de la ciencia moderna, especialmente de la biología molecular, ha sido posible diseñar exámenes de laboratorio para determinar el tamaño del segmento del material genético que causa la enfermedad en los miembros de la familia donde se está heredando. Esto permite confirmar el diagnóstico del médico y saber con cierta certeza en qué grado podrá verse afectada la persona que tenga el defecto en sus células. Además permite aliviar la preocupación en aquellos familiares que no heredaron el defecto genético. De esta manera, comprenderán mejor su enfermedad, la podrán enfrentar de una manera diferente, podrán tomar las decisiones pertinentes con respecto a la formación de su familia, y el médico tratante sabrá con certeza si es posible aplicar algún tratamiento que mejore los síntomas.

El participante tendrá la oportunidad de recibir una valoración psicológica y asesoría sobre la enfermedad. Además, en los sujetos que reciban un diagnóstico positivo o que se detecte una vulnerabilidad psicológica se hará la recomendación para que la persona sea referida a un profesional del campo de la Psicología.

Se espera que la información obtenida en este estudio, permita una mejor comprensión de las causas psicológicas y sociales que podrían estar afectando a pacientes portadores de esta condición médica, que permita en el futuro la elaboración de intervenciones más efectivas para estos pacientes y sus familiares.

E. He hablado con los investigadores sobre el estudio y me han contestado todas mis preguntas. Si tengo alguna duda, pregunta o quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a la señorita Melissa Vásquez, a la Dra. Patricia Cuenca o al M.Sc. Fernando Morales a los teléfonos: 224-3668 o 207-3047, en el INISA, al Dr. Domingo Campos a los teléfonos 207-5408 ó 207-5636 ó al Dr. Benicio Gutiérrez al teléfono 253-2121 ext. 2621 Además, puedo consultar al Ministerio de Salud al 223-26-12 sobre los derechos de los sujetos participantes en proyectos de investigación. Para cualquier información adicional puede comunicarse a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a los teléfonos 207-5840 o 207-4201.

F. Recibiré una copia de esta fórmula para mi uso personal.

G. Mi participación en este estudio es además totalmente voluntaria. Tengo derecho a negarme a participar o a discontinuar mi participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiero. También tengo derecho a elegir si deseo saber el resultado del examen.

H. Mi participación en este estudio es totalmente confidencial, nunca se harán públicos los nombres. A cada participante del estudio le será asignado un código, el cual será asociado al nombre y apellido en un registro único y confidencial al cual solo tendrán acceso los investigadores principales de este estudio. La información sobre los resultados científicos será divulgada en revistas científicas, médicas o en reuniones de expertos sin mencionar identidades. Las muestras de sangre obtenidas para este estudio,

así como otras muestras utilizadas en otros proyectos de investigación de la Universidad de Costa Rica, podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).

I. No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.

Consentimiento

Yo he leído, o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido aclaradas de manera satisfactoria. Por lo tanto estoy de acuerdo en participar en este estudio.

Deseo saber el resultado

Sí_____

No_____

Nombre, cédula y firma del sujeto (mayores de edad)

Nombre, cédula y firma del testigo

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento

Universidad de Costa Rica
Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)

Estudio genético-molecular y neuropsicológico de la Enfermedad de Huntington

Formulario 1: Entrevista

Caso índice

1- Nombre _____

2- Código del Individuo: Individuo, Familia, Generación (__, __, __)

3- Nombre completo de la persona entrevistada

4- Relación de la persona entrevistada con el caso índice

5- Apellidos y Nombre del Padre: _____

6- Apellidos y Nombre de la Madre: _____

7- Código asignado al padre: Ind, Fam, Gen: (__, __, __)

8- Código asignado a la madre: (__, __, __)

9- Dirección exacta _____

Provincia: _____ Cantón: _____

Distrito: _____ (_ _ _ _)

10- Teléfono: _____ 11- Cédula: _____

12- # de asegurado: _____ 13- Exp en el Hospital _____

14- Fecha de nacimiento: día, mes, año: __, __, ____

15- Lugar de nacimiento: Dist, Cantón, Prov.: (_ _ _ _)

16- Sexo: Masculino = 1 Femenino = 2 ()

17- Hospital : H.S.J.D = 1, H.N.P = 2 , H.C.G.= 3 , H.M.= 4, Rehabilitación = 5,

Otros (codificar) ()

Antecedentes Familiares

18- Hijo(a) de Madre (1) o Padre (2) afectado o ambos padres asintomáticos (3) (_)

19- Edad de la Madre al nacimiento: (_ _)

20- Edad del Padre al nacimiento: (_ _)

- 21- Abortos: Si = 1, No = 2; cuántos (_ ; _ _)
- 22- Hijos fallecidos: Si = 1, No = 2; cuántos (_ ; _ _) Edad al morir: (_ _)
- 23- Ocupación de la madre: Trabaja = 1 , No Trabaja = 2 (_)
- 24- Si trabaja anotar ocupación: _____ (codificar) (_ _)
- 25- Ocupación del padre: Trabaja = 1 , No Trabaja = 2 (_)
- 26- Si trabaja anotar ocupación: _____ (codificar) (_ _)
- 27- Educación de la madre: Primaria incompleta = 1
 Primaria completa = 2
 Secundaria incompleta = 3
 Secundaria completa = 4
 Universitaria = 5
 Otro _____ ()
- 28- Educación del padre: Primaria incompleta = 1
 Primaria completa = 2
 Secundaria incompleta = 3
 Secundaria completa = 4
 Universitaria = 5
 Otro _____ ()
- 29- Enfermedades durante el embarazo: _____
 _____ (codificar).
- 30- Se presenta consanguinidad en la familia: Si = 1 , No = 2 ; Grado.....(;)
- 31- Parientes con mov. coreicos (músculos de la cara, extremidades, tronco) Total: (_)
- a- Abuelos()
- b- Padre()
- c- Madre()
- d- Hermanos()
- e- Primos()
- f- Tías (os)()
- 31- Parientes con problemas de tipo intelectual: Total: (_)
- a- Abuelos()
- b- Padre()
- c- Madre()
- d- Hermanos()
- e- Primos()

f- Tías (os)()

32- Pacientes con problemas de tipo emocional: Total: ()

a- Abuelos()

b- Padre()

c- Madre()

d- Hermanos()

e- Primos()

f- Tías (os)()

33- Historia familiar de HD juvenil: Si = 1 , No = 2 ()

Estudios de laboratorio.

34- Toma de la muestra de sangre, fecha: (__ , __ , ____)

35- ACD; Si = 1, No = 2 () Heparina; Si = 1, No = 2 ()

36- Pruebas realizadas al paciente : PCR = 1 , Southern blot = 2

(__ , __ , __) (si no se realizo alguna poner 0 en su lugar)

37- El paciente resultó ser : Homocigota = 1 para la repetición ()

Heterocigota = 2

38- Se presentan indicios de heterogeneidad somática : Si = 1 , No = 2..... ()

39- Tamaño de la repetición del paciente: _____

40- Tamaño de la repetición en : Padre _____

Madre _____

41- Tamaño de la amplificación (1) o contracción (2) ()

APENDICE II:

**REACTIVOS, MATERIALES, EQUIPO
Y METODOS DETALLADOS**

Reactivos

- Acetato de Sodio
- Ácido Acético
- Ácido Bórico
- Acrilamida
- Ácido Clorhídrico= HCl
- Agarosa
- Agua destilada
- Alcohol Isoamílico
- Azul de bromofenol
- Bind Silane
- Bis-Acrilamida
- Bromuro de Etidio
- Buffer 10X
- Carbonato de potasio= KHCO_3
- Cloroformo
- Cloruro de amonio= NH_4Cl
- Cloruro de magnesio= MgCl_2
- Cloruro de sodio= NaCl
- Dimeltisulfóxido= DMSO
- Dinucleótidos= dNTPs
- Dodecil Sulfato de sodio= SDS
- EDTA
- Etanol absoluto
- Fenol
- Formaldehído
- Hidróxido de sodio= NaOH
- Iniciadores de HD: HD1 y HD3
- Marcador de peso molecular 10pb y 25 pb
- Marcador de peso molecular 50 pb
- N,N,N,N-tetramethyl-ethylenediamine= TEMED
- Nitrato de plata= AgNO_3
- Persulfato de Amonio= APS
- Proteinasa K
- Sigmacote
- Taq Polimerasa
- Tris Base
- Urea

Materiales

- Bandejas plásticas
- Bloques fríos
- Cristalería: balones, beakers, botellas ámbar, erlenmeyers, probetas, pipetas
- Descartadores
- Espátulas
- Etiquetas adhesivas y marcadores (pilot)
- Fotos para geles de agarosa
- Gradillas
- Guantes estériles y mascarillas
- Papel absorbente, papel de filtro, papel parafilm
- Pastillas magnéticas
- Pipetas Pasteur
- Plástico adhesivo
- Puntas para micropipetas
- Tubos Eppendorf de 1.5, 0.5 y 0.2 ml
- Tubos de polipropileno de 50 ml
- Tubos vacutainer con ACD

Equipo de Laboratorio

- Agitador de plataforma
- Agitadores magnéticos
- Autoclaves
- Balanza analítica
- Balanza electrónica
- Balanza granataria
- Baño María
- Bloque caliente
- Cámaras de electroforesis horizontales y verticales y accesorios (peines, separadores, vidrios, espaciadores, cinta adhesiva, prensas)
- Cámara fotográfica para geles de agarosa
- Campana de gases
- Centrífuga refrigerada
- Destilador de agua
- Espectrofotómetro
- Fuentes de Poder
- Microcentrífuga
- Microondas
- Micropipetas
- pHmetro
- Pipeteadores automáticos
- Refrigeradoras
- Rotor
- Termociclador
- Termomixer
- Transiluminador
- Ultracongeladores
- Vórtex

Extracción de ADN a partir de sangre periférica.

- 1) Poner en un tubo cónico de 50 ml, 10 ml de sangre y 30 ml de buffer lisis. Mezclar e incubar en hielo por 45 minutos.
- 2) Centrifugar por 10 minutos/1700 rpm/4°C.
- 3) Distinguir el botón de leucocitos y descartar el sobrenadante. Agregar 10 ml de buffer lisis. Disolver el botón y centrifugar por 10 minutos/1700 rpm/4°C.
- 4) Descartar el sobrenadante y añadir 5 ml de buffer SE. Disolver el botón y centrifugar por 10 minutos/1700 rpm/4°C.
- 5) Descartar el sobrenadante y el tubo con el botón se puede guardar en un untracongelador a -70°C o continuar con la extracción:
- 6) Añadir 5 ml de buffer SE y disolver el botón.
- 7) Añadir 40 µl de proteinasa K y mezclar suavemente.
- 8) Añadir 250µl de SDS al 20% y mezclar.
- 9) Incubar en baño maría a 37°C por toda la noche.
- 10) Añadir 5 ml de buffer SE y 10 ml de fenol equilibrado. Mezclar por 10 minutos en el rotor. Centrifugar por 5 minutos/3000 rpm/10°C.
- 11) Trasegar la fase superior a otro tubo cónico. Añadir 5 ml de fenol y 5 ml de cloroformo-isoamílico. Mezclar por 10 minutos en el rotor. Centrifugar por 5 minutos/3000 rpm/10°C.
- 12) Trasegar la fase superior a otro tubo cónico. Añadir 10 ml de cloroformo-isoamílico. Mezclar por 10 minutos. Centrifugar por 5 minutos/3000 rpm/10°C.
- 13) Trasegar la fase superior a otro tubo cónico.
- 14) Añadir 300 µl de acetato de sodio y mezclar.
- 15) Agregar 2 volúmenes y medio de etanol absoluto frío.
- 16) Agitar el tubo hasta que el ADN precipite.
- 17) Sacar el ADN con pipeta Pasteur de vidrio y enjuagar el ADN en etanol al 70%.
- 18) Disolver el ADN en TE y dejar disolver toda la noche en el termomixer.

Buffer Lisis pH:7.4

Llevar a 1L con agua destilada

Reactivo	Cantidad
NH ₄ Cl	8,29g
KHCO ₃	1,00g
EDTA (0.5M)	200 µl

Buffer SE pH:8.0

Llevar a 1L con agua destilada

Reactivo	Cantidad
NaCl (75 mM)	4,39g
Na ₂ EDTA (25 mM)	8,41g

Solución cloroformo-alcohol isoamílico 24:1

Reactivo	Cantidad
Cloroformo	240ml
Alcohol isoamílico	10ml

SDS 20%

Reactivo	Cantidad
SDS	20g
Agua destilada	100ml

Proteinasas K

Reactivo	Cantidad
Proteinasas K	10g
Agua destilada	1ml

Acetato de Sodio 3M, pH: 5.2

Reactivo	Cantidad
Acetato de sodio	24,61g
Agua destilada	100ml

Preparación de geles de acrilamida desnaturalizantes

- 1) Lavar los vidrios con agua tibia y detergente.
- 2) Limpiar los vidrios con etanol al 70% con pedazos de papel absorbente.
- 3) Aplicar a la superficie interna del vidrio pequeño unas gotas de Sigmacote con papel absorbente.
- 4) Al vidrio grande aplicar con papel absorbente una mezcla de ácido acético, etanol al 95% y bind silane., esperar 5 minutos y luego pasar alcohol al 70%.
- 5) Armar los vidrios con los respectivos espaciadores y sellar bien con cinta adhesiva.
- 6) Colocar las prensas a ambos lados de los vidrios.
- 7) Tomar 50 ml de la solución 6% acrilamida + 7M ureasa y agregar 450 μ l de APS al 10% y 35 μ l de TEMED y mezclar en un agitador magnético por unos segundos.
- 8) Tomar rápidamente la mezcla anterior con una jeringa y deslizarla entre los vidrios.
- 9) Colocar rápidamente un peine al revés y colocar dos prensas sobre los vidrios a la altura del peine. Esperar a que polimerice.
- 10) Dejar el gel hasta el otro día con un poco de agua y envolver en plástico adhesivo para evitar la deshidratación excesiva

Solución de acrilamida 30%:

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	30g
Bis-acrilamida	0.8g

Solución 6% acrilamida, 7M Ureasa

Aforar con agua destilada hasta 100ml

Reactivo	Cantidad
Urea	42g
TBE 5X	20ml
Soluc acrilamida 30%	20ml

Método de tinción con nitrato de plata

- 1) Colocar el vidrio grande con el gel adherido en una bandeja (A)
- 2) Colocar la bandeja A en el agitador de plataforma, agregar la solución fijadora y agitar por 20 minutos.
- 3) Sacar el vidrio con el gel de la bandeja A y colocarlo en otra bandeja: B
- 4) Guardar la solución fijadora y enjuagar la bandeja A con agua.
- 5) Colocar la bandeja B en el agitador de plataforma, agregar agua destilada y agitar por 2 minutos.
- 6) Botar el agua y agregar una vez más agua destilada. Agitar otra vez por 2 minutos y botar el agua. Colocar el vidrio con el gel en la bandeja A y enjuagar la bandeja B.
- 7) Colocar la bandeja A en el agitador de plataforma, agregar la solución de nitrato de plata y agitar por 30 minutos.
- 8) Colocar el vidrio con el gel en la bandeja B y vertir la solución de plata en un recipiente para desechos para realizar un lavado por 10 segundos (esto para eliminar el exceso de plata) e inmediatamente se coloca en la bandeja #1 y se le agrega la solución reveladora
- 9) Agitar hasta que aparezcan bandas
- 10) Cuando ya se vean bien las bandas, agregar un poco de la solución fijadora que se había guardado al inicio, esto para detener la reacción y agitar por 3 minutos
- 11) Colocar el gel en la bandeja #2 y realizar 2 lavados con agua destilada por 2 min
- 12) Dejar secar el gel a temperatura ambiente hasta el día siguiente y analizar

Solución Fijadora

Llevar a 750ml con agua destilada

Reactivo	Cantidad
Etanol absoluto	75ml
Ácido acético	4ml

Solución de plata

Diluir en 1L de agua destilada

Reactivo	Cantidad
Nitrato de plata	1g
Formaldehído 37%	1.5ml

Solución Reveladora

Diluir en 1L de agua destilada

Reactivo	Cantidad
NaOH	15g
Formaldehído 37%	1.5ml