

67

zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FRECUENCIA DE TRINUCLEOTIDOS REPETIDOS
CAG DEL GEN DE LA ENFERMEDAD DE
HUNTINGTON EN LA POBLACION MEXICANA
NORMAL Y DIAGNOSTICO MOLECULAR



EXAMEN ESPECIALIZACIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

CLAUDIA MARTINEZ ANAYA



MEXICO, D. F.

1985

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

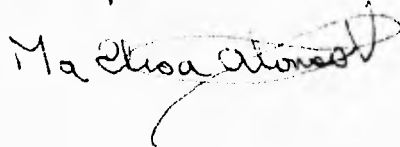
Presidente	Prof. Gerardo Kono Yaiko
Vocal	Med. Cir. Elisa Alonso Vilatela
Secretario	Prof. Marisol López López
1er Suplente	Prof. Alicia Cervantes
2do. Suplente	Prof. Marina Gavilanes Ruiz

Trabajo Desarrollado en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA.

Sustentante Claudia Martínez Anaya



Asesor Med. Cir. Ma. Elisa Alonso Vilatela



Dedicada a:

Mis Papás. Simplemente porque son TODO para mí.

**Mis Hermanos Oscar, Liliana y Oliver
porque aunque nunca se los diga los quiero mucho.**

**Toda mi Familia, incluyendo al más reciente miembro
el pequeñito Leonardo.**

Agradecimientos:

**A la Dra. Alonso
Por darme la oportunidad de realizar este Trabajo**

**A todos mis amigos del Departamento de Genética del INNN:
Petra y Aurelio por enseñarme todo sobre PCR y otras técnicas del laboratorio.
A Lety, Adriana, Conchita, Sr. Arellano, Salvador, Alicia, Rosario y Jorge.**

**A mis amigos del Departamento de Genética
y Biología Molecular
del CINVESTAV por la asesoría para la realización de los ensayos de PCR:
Lupita Silva, Diego Arenas, Benito Estrada,
Emelia Hernández y Eduardo García.**

**A la QFB Eva Ramírez Arroyo por su gran ayuda en la Determinación
Estadística de las Frecuencias de los Sistemas Sanguíneos**

Con todo cariño a todos mis amigos de la
Facultad de Química:
Euclides, Pily, Lupita, Agustín, Fabián, Paty, Ricardo, Dea, Mónica R.,
Vero A., Karl, Susi, Martha, Liz, Omar, Carmen y Gustavo.

A mis amigos:
Sandra, Mónica M., Jesús, Edgar, Angélica, Gina y Eduardo
Por ser como son.

A Vero por ser la mejor amiga.

A mis amigos de Química de Alimentos.

A mis amigos Beto y especialmente a Luis.

CONTENIDO

	Pag.
Resumen	i
1. Antecedentes	1
Enfermedad de Huntington	1
Neuroquímica de la Enfermedad de Huntington	3
Herencia de la Enfermedad de Huntington	4
Análisis de Ligamiento	5
Nucleótidos Repetidos	8
Enfermedades con Trinucleótidos Repetidos	9
Mutaciones de las Regiones No Traducidas	12
Mutaciones de las Regiones Codificadas	13
Mutación del Gen de la Enfermedad de Huntington	15
Rangos Normales y Afectados en la Enfermedad de Huntington	20
Inestabilidad del Gen IT15	22
Edad de Inicio	24
Perspectivas	25
2. Objetivos	26
3. Desarrollo Experimental	27
A) Marcadores Genéticos	27
Sistemas Sanguíneos	27
Haptoglobinas	27
B) Polimorfismo del Gen IT15	28
Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
Componentes de la Mezcla de Reacción	31
Uso del PCR en Investigación de la Enfermedad de Huntington	32
Marcador de Peso Molecular	35
4. Material y Métodos	37
Determinación de Grupos Sanguíneos	37
Reactivos	37
Sistema ABO	37
Sistema Rh-Hr	37
Sistema MN	38
Sistema Duffy	38

Electroforesis de Haptoglobinas	38
Reactivos	38
Preparación del Gel	39
Hemolisado	39
Preparación de la Muestra y Electroforesis	39
Tinción	39
Extracción de DNA	40
Reactivos	40
Lisis de Glóbulos Rojos	40
Lisis de Glóbulos Blancos y Extracción Fenol-Cloroformo	40
Microextracción con Sales y Fenol-Cloroformo	41
Cuantificación de DNA en geles de Agarosa	41
Reactivos	41
Tratamiento de DNA Degradado con GeneClean	42
PCR del Repetido (CAG) _n del Gen IT15	42
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	43
Reactivos	43
Preparación del Gel	44
Secuenciación del Plásmido pBSMB	44
5. Resultados	47
Marcadores Genéticos de Poblaciones	47
Cuenta Génica para la Determinación de los Genes ABO	48
Cuenta Génica para Determinar la Frec. de los Genes MN	49
Cuenta Génica para Determinar la Frec. de los Genes Rh-Hr	50
Cuenta Génica para Determinar la Frec. de los Genes Fy ^a y Fy ^b	54
Extracción de DNA	57
Amplificación pos PCR	60
Genes Afectados	73
6. Discusión	78
Uso del PCR para la Determinación de la Secuencia Repetida CAG	78
Polimorfismo de la Secuencia CAG Repetida	80
Secuencia (CAG) _n Expandida	82
Rangos Normales y Afectados en la Población Estudiada	85
7. Conclusiones	87
8. Referencias	89

RESUMEN

La Enfermedad de Huntington (HD) es un padecimiento neurodegenerativo, progresivo de inicio tardío que presenta una herencia autosómica dominante, caracterizado por movimientos coreicos, alteraciones de conducta y demencia.

Al igual que algunos otros trastornos hereditarios tales como el Síndrome X-Frágil y la Distrofia Miotónica, la alteración en el gen HD es debida a la expansión de una secuencia de trinucleótidos repetidos.

En 1993 se identificó el gen responsable de la enfermedad, en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 4 (en 4p16.3) y se le denominó IT15. Consta de 67 exones y contiene un trinucleótido repetido CAG inestable que se expande en los individuos afectados.

Este gen codifica para una proteína que posiblemente contenga 3144 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 348 KDa. Esta proteína se ha llamado provisionalmente Huntingtina y hasta el momento se desconocen sus funciones (21).

El recientemente descrito gen IT15 contiene una región polimórfica de trinucleótidos CAG repetidos, variando el número de copias de 11 a 34, mientras que los pacientes muestran expandidos más allá de 36 unidades.

Con el presente trabajo se determinó un rango normal de esta región polimórfica CAG en la población mexicana, así como también los alelos expandidos de personas afectadas de una familia con antecedentes de la enfermedad, usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la secuencia repetitiva. Los productos amplificados fueron resueltos en electroforesis en gel de poliacrilamida y expuestos en placas autorradiográficas. Se utilizó un plásmido marcado radiactivamente como marcador de peso molecular, para determinar el número de repetidos de los alelos normales y afectados presentes en nuestra población.

1. ANTECEDENTES

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La Enfermedad de Huntington fue descrita por vez primera en 1873 por el médico norteamericano George Huntington. Se caracteriza principalmente por edad de inicio tardía, generalmente entre la 4a. y 5a. década de la vida, movimientos involuntarios, alteraciones psiquiátricas y demencia (17).

Los estudios epidemiológicos han revelado una distribución normal de la edad de inicio de esta enfermedad, en la que los pacientes con inicio menor a los 20 años y mayor a los 60 representan la minoría, mientras que la mayor parte comienzan alrededor de los 40 años (4).

Aproximadamente el 10% de los pacientes presentan inicio anterior a los 20 años, correspondiendo éste a las formas de Enfermedad de Huntington juvenil que abarca del los 11 a los 20 años, y Enfermedad de Huntington infantil con inicio en niños de 10 años y menores. A diferencia de la forma adulta, en la que los movimientos coreicos son los más característicos de la enfermedad, en los casos infantiles y juveniles la espasticidad y rigidez son las alteraciones motoras más severas, además de un rápido deterioro intelectual, lo que provoca un curso progresivo más rápido. Los primeros síntomas en estos pacientes son el fallo escolar y los problemas de comportamiento (61).

En ocasiones, en algunas familias con las formas juveniles de la enfermedad, los hijos presentan los signos y síntomas antes que sus padres, dando la impresión de que la enfermedad dio un salto en las generaciones. Este proceso se conoce como anticipación.

Aproximadamente un 25% de los pacientes muestran un inicio tardío de la enfermedad (mayor a los 50 años), y se han observado que en estos casos el padecimiento es menos debilitante (midiendo como capacidad funcional), debido a la lenta progresión de los síntomas (25).

En poblaciones extranjeras se ha determinado que la incidencia de Enfermedad de Huntington es de 1 en 10,000 habitantes, y de 4 a 8 por 100,000 en la mayoría de las poblaciones europeas (25). En México esta cifra se desconoce, sin embargo, en una revisión realizada en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se encontró este diagnóstico en el 0.2% de los expedientes. Actualmente se conocen mas de 100 familias en nuestro país con este padecimiento (1, 2, 3, 44).

La Enfermedad de Huntington presenta un patrón de herencia mendeliano típico autosómico dominante y su principal signo son los movimientos musculares involuntarios (llamados coreicos), que pueden ser precedidos o no de trastornos conductuales y psicológicos (18).

Tanto los movimientos coreicos como los cambios de conducta son consecuencia de la muerte neuronal prematura en el ganglio basal y el núcleo caudado principalmente, y en menor grado en el putamen, lóbulo frontal, lóbulo parietal y ocasionalmente en toda la corteza cerebral (23).

Se ha observado que las crisis epilépticas son ligeramente más frecuentes en pacientes adultos con Enfermedad de Huntington que en la población general. Son también comunes en los casos tempranos y afectan del 30 al 50% de los pacientes juveniles, y aún con la ayuda de antiepilépticos son de difícil control (25).

Una vez iniciados los síntomas, comienzan a progresar irreversiblemente, prolongándose hasta 10 o 20 años después, incapacitando al paciente tanto de valerse por sí mismo como de comunicarse (17).

De manera general, puede dividirse a la Enfermedad de Huntington en 4 etapas de 5 años cada una (23):

1. En el inicio de la enfermedad hay pérdida de la coordinación muscular, moderada e inconsciente, alteraciones de memoria y comienzan los cambios de personalidad junto con la desorganización. Entre los diferentes cambios de conducta se pueden incluir ansiedad, agresión, mayor irritabilidad, promiscuidad, y otros cambios psicológicos, tales como cuadros similares a la esquizofrenia, psicosis y alucinaciones. El paciente puede caer en una depresión crónica.

2. En este segundo período comienzan los movimientos coreiformes, los problemas de lenguaje se hacen más evidentes (pronunciación incompleta y en ocasiones irregular) y es posible que se produzcan también sonidos explosivos e impredecibles.
3. A aproximadamente 10 años de haber comenzado la enfermedad el paciente se encuentra ya totalmente al cuidado personal e inclusive institucional, debido a la pérdida de las funciones corporales que caracterizan esta tercera etapa.
4. Este es el cuarto estadio final, completamente vegetativo, en el que los individuos permanecen inmóviles hasta la muerte, que generalmente es consecuencia de complicaciones cardíacas o neumonía grave seguida de aspiración.

Hasta este momento no se cuenta con terapia química ni física para la curación o rehabilitación de los pacientes, por lo que además de afectar al portador del gen, los familiares y amigos de éste reciben también un severo impacto. El consejo genético ha sido siempre difícil en esta enfermedad, debido a su gravedad progresiva, incapacidad y alto riesgo de transmisión hereditaria (17, 28).

NEUROQUÍMICA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Para explicar la muerte neuronal acelerada que provoca la enfermedad, se ha propuesto la Hipótesis Excitotóxica. Esta teoría propone que en la muerte celular, aminoácidos excitatorios (EAA) producidos endógenamente o sustancias cercanamente relacionadas involucradas en neurotransmisión, dañan y matan a las neuronas que crónicamente han estado expuestas a sus efectos. Se piensa que las neuronas sensibles son las que tienen receptores para los EAA, como por ejemplo para el N-metil-D-aspartato (NMDA), para el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), y el receptor para el kainato (25).

Los experimentos que fundamentan esta teoría, han demostrado que las inyecciones de ácido kainico, un análogo del glutamato, en el cuerpo estriado de la rata, destruyen casi todas las neuronas mientras que las células gliales y las aferentes permanecen intactas. Tanto los agonistas de NMDA (ácido quinolinico y ácido homocístico) como el NMDA mismo producen daño estriatal que semeja los cambios estructurales y neuroquímicos de la enfermedad. Existen además, abundantes receptores de EAA en el cuerpo estriado y la unión de NMDA, AMPA y kainato se encuentra significativamente disminuida en

pacientes con Enfermedad de Huntington. Este fenómeno se ha observado también en individuos presintomáticos (25).

Sin embargo, en contra de esta hipótesis, se tiene el hecho de que la exitotoxina misma no ha sido identificada, aunque se piensa que pudiera ser el glutamato. La única presencia de los receptores para EAA no es una explicación suficiente para la muerte neuronal en este padecimiento, ya que otras células del cerebro que contienen los receptores para EAA, aparentemente no se encuentran afectadas. Para explicar este hecho se ha pensado que otros factores pudieran estar influyendo, y éstos incluyen (25):

- a) Liberación alterada de glutamato
- b) Producción inapropiada de un EAA diferente
- c) Captación anormal por parte de las células gliales e inactivación de los EAA
- d) Alteraciones en la estructura del receptor de EAA
- e) Función mitocondrial anormal que modifica la función del receptor de EAA o la captación de calcio
- f) Inactivación insuficiente del calcio libre intracelular.

HERENCIA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Como se mencionó, la Enfermedad de Huntington presenta una herencia autosómica y completamente dominante ya que se ha reportado que no hay diferencia aparente en la sintomatología entre personas homocigotas de aquellas heterocigotas. Se sabe también que en estos pacientes homocigotos las manifestaciones de la enfermedad no son tampoco más severas ni de inicio anterior (24). Las mutaciones completamente dominantes son raras en la literatura (29).

La penetrancia, es decir el grado en el cual el gen afectado produce su efecto, es del 100% en pacientes con Enfermedad de Huntington, por lo cual tienen un pronóstico obligadamente fatal, debido a que la persona que presente la mutación, forzosamente desarrollará la enfermedad.

Debido al inicio tardío de la enfermedad, la mayoría de los pacientes ya han tenido hijos al momento de hacer el diagnóstico, al igual que los portadores del gen (individuos en riesgo), provocando que su descendencia tenga un 50% de posibilidad de heredar la mutación.

Es característico que la mayoría (80%) de los pacientes con formas de Enfermedad de Huntington juvenil son hijos de varones afectados (29).

ANALISIS DE LIGAMIENTO

Para probar las nuevas técnicas de la tecnología del DNA recombinante, en 1980 la Enfermedad de Huntington fue escogida como modelo para que con su aplicación pudiera conocerse con toda exactitud la localización del gen responsable de la enfermedad dentro del genoma humano, sin tener antecedentes previos que pudieran dar alguna idea de donde comenzar a buscar. Para este propósito, Gusella y cols. (17), tuvieron que tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Los alelos de dos genes localizados uno cerca del otro en el mismo cromosoma pasarán juntos a la progeñe, con una alta frecuencia, por lo que se dice que están genéticamente ligados, y no serán heredados juntos cuando durante la meiosis ocurren eventos de recombinación entre los cromosomas de las células de los padres.

2. La frecuencia con la cual los eventos recombinantes ocurren entre los dos genes ligados es usada como una medida de la distancia que los separa, es decir que mientras menos se produzca la recombinación menor será la distancia entre los dos genes.

Para la localización del gen HD, se requería primero encontrar características diferentes que segregaran con la enfermedad en estudios familiares, por lo que se requirió de dos cosas importantes:

- a) la disponibilidad de marcadores genéticos suficientes para probar la presencia del gen en el genoma completo y,
- b) familias muy grandes con antecedentes de Enfermedad de Huntington para obtener la significación estadística de los marcadores.

Este tipo de estudios se conoce como Análisis de Ligamiento.

En los primeros estudios realizados, se probaron sin éxito marcadores polimórficos de proteínas, descartando el 15% del total del genoma de las regiones autosómicas y también los cromosomas sexuales por no ser ésta una enfermedad ligada al sexo. Sin

embargo para el 80% del material restante fue necesaria la generación de nuevos marcadores genéticos (17).

Tomando en cuenta que las diferencias heredadas entre las personas no son sino la consecuencia de las diferencias en la secuencia primaria del DNA se pensó entonces que las secuencias polimórficas (secuencias con variación entre los DNA de diferentes personas) podrían ser usadas como marcadores genéticos para rastrear la herencia de los genes localizados cerca de ellas (figura 1).

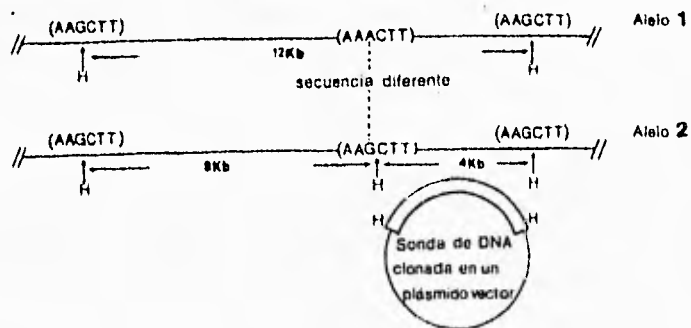


Figura 1. RFLP Hipotético. El alelo 1 carece de una de las tres secuencias de restricción para la enzima Hind III por lo que con su digestión se obtendrá un fragmento de 12 Kb. El alelo 2, por tener los tres sitios produce dos fragmentos uno de 4 Kb y otro de 8 Kb. El fragmento de 4Kb es clonado en un vector y posteriormente es usado como sonda para la determinación del genotipo de cada persona. (Modificado de 17)

Con el uso de las enzimas de restricción que cortan al DNA, de manera obligatoria, en sitios específicos (el cambio en una sola base en la secuencia del sitio de reconocimiento de la enzima evitará el corte), pudieron determinarse las diferencias en la secuencia del DNA que afectan los sitios de restricción y por lo tanto también el tamaño de los fragmentos generados de una región particular del genoma.

Debido a que tan sólo una enzima de restricción es capaz de digerir al DNA genómico humano en aproximadamente un millón de fragmentos, para detectar aquellos de tamaño específico fue necesaria la aplicación de la técnica de hibridación DNA-DNA tipo Southern Blot (figura 2).

En esta técnica los fragmentos producidos por la enzima son resueltos por electroforesis en geles de agarosa y transferidos después a membranas sólidas que son entonces hibridadas con sondas (secuencias particulares del DNA humano previamente clonado en una bacteria) marcadas ya sea con radiactividad o algún sistema luminiscente. El alineamiento de la sonda con su secuencia complementaria detectará un fragmento cuyo tamaño puede ser entonces determinado exponiendo la membrana a placas autorradiográficas. Gracias a que la secuencia escogida como sonda se encuentra en sólo una posición dentro de todo el genoma, puede entonces ser usada como marcador genético para el ligamiento de otros genes a ese sitio en particular. Si es que se detecta una variación significativa de dicha secuencia, esta variación o polimorfismo detecta las diferencias individuales en el patrón de rompimiento observado por la enzima de restricción usada.

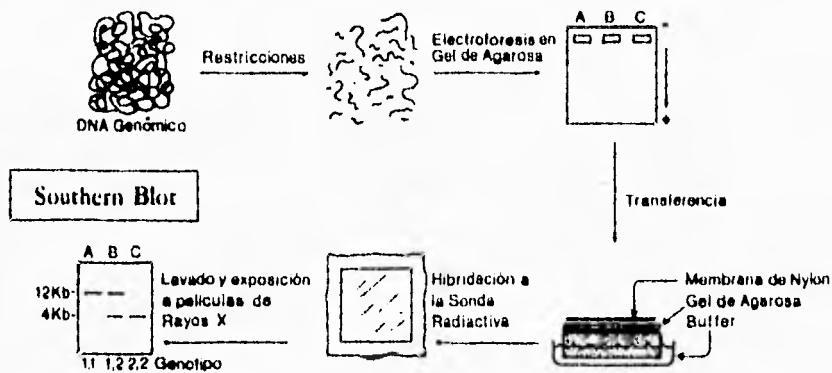


Figura 2. Southern Blot. Permite determinar los diferentes genotipos, requiere la digestión del DNA genómico por una enzima específica (Hind III por ejemplo) y la separación de los fragmentos en electroforesis en gel de agarosa. Después de pasar los fragmentos a un soporte sólido, son hibridados con una sonda radiactiva. El sitio de la hibridación indica el peso molecular del fragmento y por lo tanto el genotipo de cada individuo. (Modificado de 17)

Estas secuencias del DNA genómico que varían en tamaño en diferentes personas al ser digeridas con enzimas de restricción en sus sitios de reconocimiento son llamadas Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) (28). Estos RFLP's están distribuidos a todo lo largo del genoma humano, se heredan como un rasgo mendeliano codominante simple y son relativamente fáciles de identificar. A diferencia de los clásicos marcadores polimórficos de proteínas, los polimorfismos de DNA pueden encontrarse o no en la región codificada y no importa que provengan de un gen desconocido o de un segmento anónimo. De esta manera, con el uso de estos RFLP's fue como pudieron generarse marcadores en todas las regiones del genoma. La sonda G8 usada como marcador molecular, fue la que mayor ligamiento mostró con la Enfermedad de Huntington, e identificaba fragmentos provenientes del cromosoma 4, tanto en familias norteamericanas como en una gigantesca familia venezolana con antecedentes de Enfermedad de Huntington (17).

Sin embargo, este método de análisis de ligamiento es poco informativo para los casos que involucren no paternidad y para padres que sean homocigotos para un marcador genético, además pueden también ocurrir errores de interpretación debidos a la recombinación meiótica. Tampoco es posible obtener información útil para ciertas personas, tales como aquellas con familias pequeñas o fragmentadas (28).

NUCLEOTIDOS REPETIDOS

De manera normal, repartidos de forma no específica dentro del genoma humano, existen secuencias repetitivas de nucleótidos, pudiendo estar agrupadas de dos en dos (CA)_n, en forma de tripletes (CAG)_n, como tetranucleótidos (CCTT)_n o (GGCA)_n, en grupos de cinco (GGGCA)_n, y aún más grandes (50).

Genes con trinucleótidos repetidos se han encontrado anteriormente en los cromosomas de *Drosophila* y en el ratón. Estos genes contienen secuencias CAG o CAA repetidas que codifican para glutamina y son conocidos como repetidos OPA, y frecuentemente se encuentran en genes homeodominantes o de proteínas unidoras de DNA. Existen también en *Drosophila* repetidos GGN, conocidos como repetidos Pen, que a menudo codifican para tramos de glicina. Es por estas razones que se piensa que estos genes representan secuencias conservadas entre las especies, con funciones desconocidas en la mayoría de los casos (54).

Hasta el momento se desconoce la función de estas secuencias repetidas dentro de los genes de mamíferos, pero se ha detectado que varían en tamaño entre los diferentes individuos, es decir son polimórficas (39).

La variación del tamaño de estas secuencias entre los cromosomas pudiera decirse que se encuentra restringida, y se ha observado que un aumento en el número de copias de ciertos trinucleótidos repetidos está asociado con alguna afección; a esta variación del tamaño de un cierto repetido en un gen determinado entre las diferentes generaciones de individuos de una familia se le ha llamado Inestabilidad (50, 54).

Hasta el momento siete padecimientos que involucran este tipo de mutación han sido reportadas. Más adelante se describirán brevemente las características de cada una y de manera mas detallada la que provoca la Enfermedad de Huntington.

ENFERMEDADES CON TRINUCLEOTIDOS REPETIDOS

La Enfermedad de Huntington no es la única causada por la expansión de tripletes repetidos, ni tampoco fue la primera en ser detectada. En 1991, el Síndrome X-Frágil fue el primer padecimiento detectado que era provocado por la expansión de una secuencia inestable de trinucleótidos repetidos, posteriormente en la Atrofia Espinobulbar Muscular, la Distrofia Miotónica, la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 1, el sitio frágil FRAXE del cromosoma X y la Atrofia Dentatorrubral Palidolusiana han sido encontradas secuencias repetidas que afectan los genes responsables, provocando estos padecimientos que tienen todos relación directa con el Sistema Nervioso Central (7, 39).

Los padecimientos provocados por la expansión de trinucleótidos repetidos representan un nuevo e inusual mecanismo de mutación en mamíferos, en el que una secuencia simple de tres nucleótidos dentro de un gen específico crece incontroladamente (50).

De manera importante, ninguno de los genes antes mencionados muestra un gradiente continuo de repetidos del estado normal al patológico; en lugar de esto los alelos normales mantienen su estrecha inestabilidad dentro de un rango bien delimitado. Estos alelos normales son remarcablemente estables, y su transmisión a un rango de tamaño inestable nunca ha sido observada, mientras que los repetidos dentro de un pequeño subgrupo de genes anormales (genes premutados) brincan hasta alcanzar un tamaño que

provoca una enfermedad. Una vez dentro del estado anormal, los repetidos se vuelven altamente inestables provocando un aumento en la variabilidad del tamaño del gen en las generaciones siguientes (7).

Todas las expansiones muestran marcadas diferencias en la sintomatología clínica, tanto entre los pacientes de una misma enfermedad y dentro de la misma familia, como entre las diferentes enfermedades producidas por este tipo de mutación, a pesar de que todas ellas involucran al SNC.

Sin embargo, este nuevo tipo de mutación explica y provee los posibles mecanismos para fenómenos poco entendidos, tales como la penetrancia incompleta debida a la existencia de premutaciones, la expresividad variable tal como se observa en el Síndrome X-Frágil en el que dentro de una familia varios miembros pueden presentar retraso mental en diferentes grados, debido a los distintos tamaños de expansiones para cada persona. También explica la presencia de sitios frágiles dentro de los cromosomas y el fenómeno de anticipación que se refiere al hecho de que la edad de inicio de la enfermedad tiende a disminuir y la severidad de ésta aumenta en generaciones sucesivas de familias portadoras de una enfermedad específica (38, 60).

Para todos los casos de padecimientos debidos a la expansión de secuencias repetidas, un número de tripletes mayor al establecido como normal provocará que un individuo presente la enfermedad, pero si el repetido es de mucho mayor tamaño que el normal entonces se provocará un inicio más temprano del padecimiento, una más rápida progresión o síntomas más severos. Se tiene, por lo tanto, una relación directa del número de tripletes repetidos y la gravedad de la enfermedad (61).

El umbral al cual los trinucleótidos repetidos se convierten en inestables parece ocurrir sobre las 30 copias para las expansiones CAG y de aproximadamente 50 unidades para las de FRAXA (Síndrome X-Frágil), FRAXE y Distrofia Miotónica. Los genes con estos valores son llamados premutados (50).

Se han determinado una serie de características comunes para estos padecimientos:

1. El sitio de expansión en individuos afectados son repetidos ricos en CG
2. El repetido se encuentra presente en el transcrito maduro
3. El repetido tiene longitudes polimórficas entre los individuos normales

4. En familias afectadas el alelo mutado presenta inestabilidad meiótica provocando la expansión, que no se encuentra en los respectivos alelos polimórficos normales, es decir que el grado de mutación a otro tamaño es muy diferente entre los genes normales y afectados (50).

Sin embargo, y a pesar de las características comunes que comparten las enfermedades debidas a este tipo de mutación, existen diferencias muy importantes entre ellas. En primer lugar, es posible dividir las enfermedades determinadas según la posición que el trinucleótido ocupe dentro del gen, es decir que se encuentre o no en una región traducida (7).

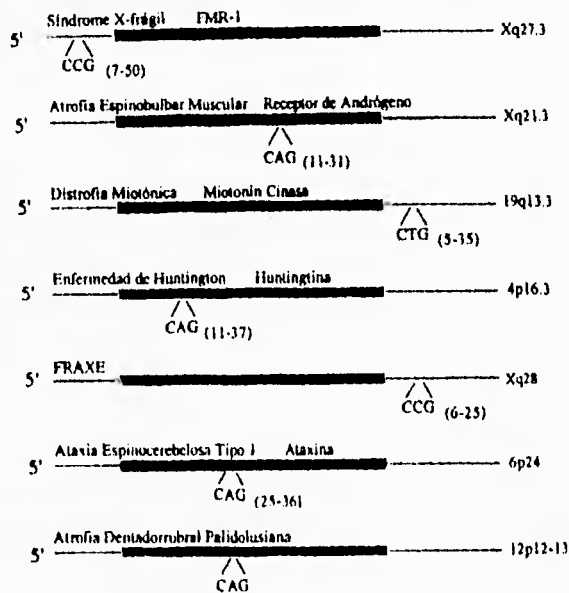


Figura 3. Representación gráfica de los diferentes loci de las siete enfermedades producidas por la expansión de tripletes repetidos. Las bandas gruesas indican el marco abierto de lectura de cada gen, y las delgadas son las regiones no traducidas 5' y 3'. Se indica la localización y la secuencia de cada triplete, y para las que se conoce, el rango normal está entre paréntesis. (Modificado de 42)

MUTACIONES DE LAS REGIONES NO TRADUCIDAS

Las mutaciones que se encuentran en alguna región no traducida del gen (UTR), provocan las siguientes enfermedades:

SINDROME X-FRAGIL: es un padecimiento que provoca retraso mental en niños, y fue la primera enfermedad asociada a la expansión del triplete CCG dentro del gen FMR-1 localizado en el cromosoma Xq27.3. Este repetido se localiza en la región 5' UTR de un gen que codifica para una proteína de función desconocida hasta el momento. Se ha reportado que dentro de los genes normales el número de repetidos va de 7 a 50 unidades CCG. En niños con el Síndrome X-Frágil el tamaño del repetido está expandido desde 200 hasta 2000 unidades, siendo los casos más severos de la enfermedad aquellos con los expandidos más grandes. El rango que abarca de 52 a 200 tripletes no causa la sintomatología, pero puede expandirse fácilmente en la siguiente generación hasta alcanzar los valores afectados, éste es el rango intermedio de premutación que únicamente progresa hasta una mutación completa cuando se transmite por vía materna (39, 40).

No se sabe con exactitud el efecto que provoca esta expansión dentro de la célula, pero si se ha observado que en linfocitos con más de 200 copias repetidas la expresión del gen se detiene por completo, debido a que esta región se inactiva por metilación. Un fenómeno importante se refiere a la existencia de células con números diferentes de trinucleótidos tanto en las de los diferentes tejidos como en las de un mismo tejido, es decir que presenta un gran mosaicismo. Sin embargo, en un varón afectado las células germinales no contienen la mutación completa (39, 40, 48, 65).

DISTROFIA MIOTONICA: fue la segunda enfermedad reportada que es producida por la expansión del triplete CTG localizado en la región 3' no traducida del gen de una probable proteína cinasa y cuyo locus en el cromosoma es 19q13.3. Para este caso, el número de tripletes repetidos en la población normal va de 5 a 35 copias, un número entre 50 y 100 unidades se considera como una premutación, y los valores afectados van de 100 a 2000 trinucleótidos. Se ha encontrado una alta correlación entre la severidad y la edad de inicio de esta enfermedad con el número de copias de este gen. Además, existe una alta influencia del sexo del padre portador sobre la inestabilidad del gen, ya que los pacientes de distrofia miotónica congénita son los que presentan los mayores tamaños y son exclusivamente hijos de mujeres afectadas o portadoras. También en este caso se presenta

mosaicismo, pero a diferencia del Síndrome X-Frágil, aquí es solo tejido-específico (9, 40, 60).

FRAXE: este es el último padecimiento que se ha encontrado que es producido por la expansión de una secuencia CCG. Esta mutación provoca un sitio frágil en el cromosoma X diferente al del Síndrome X-Frágil. Esta es por lo tanto una enfermedad de herencia ligada al X, que provoca un tipo de retraso mental moderado en niños cuando en el gen se encuentran repetidos mayores a 200 unidades. El rango para la población normal es limitado ya que contiene tan sólo de 6 a 25 copias y los portadores de una premutación contienen de 26 a 200 trinucleótidos en sus genes. Hasta el momento se desconoce la vía por la cual la inestabilidad se transmite a través de las generaciones. Tampoco se conoce la proteína para la cual codifica este gen, pero sí se sabe que el repetido se encuentra en una zona no traducida de éste (40, 60).

MUTACIONES DE LAS REGIONES CODIFICADAS

ATROFIA MUSCULAR ESPINOBULBAR: también conocida como Enfermedad de Kennedy, fue la primera enfermedad en ser reportada que es causada por la expansión de un trinucleótido repetido CAG, pero a diferencia de las anteriores mutaciones, éste se encuentra en un exón del gen del receptor de andrógeno y también se localiza en el cromosoma Xq21.3. Presenta un tipo de herencia recesiva ligada al X. En la población normal este trinucleótido, que codifica para el aminoácido glutamina, es polimórfico y contiene entre 11 y 31 repetidos, mientras que expandidos de 40 y hasta 62 provocan el fenotipo afectado. El efecto de esta expansión se supone que se encuentre al nivel de la síntesis de una proteína defectuosa. La inestabilidad del repetido se lleva a cabo cuando es transmitido por vía materna y se ha visto que un número mayor de unidades disminuye la edad de inicio de los síntomas (39, 40, 60).

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON: como ya se ha mencionado el gen de la enfermedad de Huntington, fue descubierto en marzo de 1993. Se determinó que la mutación es consecuencia de la expansión de una secuencia repetida CAG que se encuentra, en un exón de la proteína llamada hungtintina, cuyas funciones son desconocidas (23, 40, 52, 60).

ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 1: fue el tercer padecimiento que se reportó a finales de 1993. Esta enfermedad es causada por la expansión de repetido CAG que se encuentra en un exón de un gen de funciones desconocidas y que se localiza en 6p24. Se sabe que este gen está altamente expresado en las células del músculo esquelético de las personas afectadas, por lo que se supone que provoca un aumento en la actividad de la proteína. Este trinucleótido se encuentra repetido de 25 a 36 veces en personas normales y de 43 a 81 en individuos afectados. Sin embargo, una expansión de más de 40 repetidos interrumpida por una secuencia de restricción para la enzima *SfaNI*, no provocará la enfermedad. Se ha reportado una mayor inestabilidad del gen cuando es transmitido por vía paterna (40).

ATROFIA DENTADORRUBRAL PALIDOLUSIANA: finalmente, a principios de 1994, se reportó la última enfermedad provocada por la expansión del mismo repetido CAG, del que únicamente se sospecha que se encuentre en una región traducida de su gen, debido a que los rangos en los que este triplete se presenta en la población normal y afectada son muy similares a los reportados para la enfermedad de Huntington y para la Atrofia Espinobulbar Muscular. El gen responsable se encuentra en 12p12-13 (62).

Los estudios realizados con el fin de encontrar nuevos genes con este tipo de secuencias triples repetidas, han establecido que las expansiones CAG asociadas a enfermedades neurodegenerativas sean más probablemente traducidas a su aminoácido, generando un tramo de residuos de glutamina, limitando por lo tanto la secuencia a dicho repetido CAG. Los mecanismos por los cuales los expandidos de las regiones no traducidas ejercen su efecto no son conocidos aún, pero todos los sitios frágiles de los cromosomas podrían ser explicados por estas expansiones, y si la metilación en estos sitios es un requerimiento, las secuencias se reducirían a CGN (N= A, C, T, G). Otros experimentos han reportado que repetidos CGG en 5'UTR de autosomas no muestran los sitios frágiles (al ser cultivados en ausencia de folato) tal como se han visto en el cromosoma X, por lo que se han considerado los siguientes puntos para explicar este fenómeno: a) no exhiben la expansión; b) la expansión no es de la magnitud de la del X-Frágil; c) estos repetidos que se encuentran en otros sitios del genoma no expresan los sitios frágiles; d) la metilación que se requiere no ocurre (7, 50).

A pesar de que 10 posibles combinaciones de trinucleótidos son posibles, solamente los CTG, CAG y CGG se han asociado con expansiones anormales. La mayor parte de estos nucleótidos repetidos que se han detectado en regiones 5' UTR en genes nuevos son CGG y son los más polimórficos, los repetidos menos variables se detectaron en exones. Este hecho puede explicarse por que debe haber una mayor protección contra la variabilidad en las secuencias codificadas. Se han detectado genes con secuencias triples consecutivas perfectas, todos expresados en el cerebro y el cerebelo variando su abundancia de leve a moderada. Su distribución abarca múltiples autosomas y el cromosoma X. Se piensa que de 50 a 100 genes expresados en el cerebro tienen este tipo de secuencias. La mayoría de los genes que contienen repetidos en el marco abierto de lectura para la traducción, incluyen secuencias codificadoras para glutamina en su mayor parte, glicina y serina, dando lugar a proteínas solubles (54).

Algunos cDNA codifican para rRNA 28s que se sabe contiene (CGG)_n. Otros genes ya conocidos incluyen a la apoferritina humana, a la ATPasa de sodio y potasio y a la proteasa dependiente de calcio, todos con secuencias repetidas (54).

La función de aminoácidos simples repetidos en la secuencia de las proteínas es desconocida, pero su presencia en un gran número de factores de transcripción, sugiere que en algunos casos pudieran intervenir en la interacción proteína-DNA, como los repetidos Pen de *Drosophila* que codifican para tramos de poliglicinas, y que están también presentes en su homólogo de rata, dando como resultado proteínas desestabilizadoras de la hélice (54).

Según la experiencia adquirida con los tripletes de las enfermedades descritas, se cree que los genes nuevos encontrados que se presentan como altamente polimórficos en la población normal, son candidatos potenciales para la expansión con consecuencias patológicas (50, 54).

MUTACION DEL GEN DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Una vez localizado el cromosoma en el que se encontraba el gen responsable de la enfermedad, fue necesario mapear una gran región cercana al telómero del brazo corto del cromosoma 4 usando una gran cantidad de marcadores moleculares generados con diferentes enzimas de restricción (41, 51).

De esta forma el mapa físico del telómero quedó mapeado con los siguientes *loci* (41, 51):

Centrómero ← D4S10 D4S126 D4S125 D4S127 D4S95 D4S43 D4S98
D4S113 D4S168 D4S115 D4S111 D4S90 D4S142 → Telómero

A principios de 1993 fue publicado un trabajo en el que se dio a conocer la posición exacta (figura 3) del gen responsable de la Enfermedad de Huntington dentro de la región mencionada (24).

En esta publicación del Grupo Colaborativo en la Investigación de la Enfermedad de Huntington se da a conocer un nuevo gen llamado IT15 que contiene un trinucleótido CAG repetido muy cerca del extremo 5', y que se supone está incluido en el marco abierto de lectura del gen, es decir que probablemente pertenezca a su primer exón; este trinucleótido muestra polimorfismo entre los individuos y es inestable al paso de las generaciones (24).

Este gen IT15 abarca aproximadamente 210 Kb dentro del cromosoma 4 y produce un cDNA de 10366 bases a partir de los 67 exones que lo componen (60). Inicialmente se reportó la presencia de un transcrito de 10.3 Kb, sin embargo poco tiempo después fue encontrado un mRNA con una secuencia idéntica tanto de la región codificadora como del extremo 5' no traducido, pero que contiene una secuencia adicional en el extremo 3' no traducido, diferente al primero (HD12) desde la base 10,350. Esta diferencia en la secuencia provoca una poliadenilación de este segundo transcrito dando como resultado un mRNA de 13,711 bases (HD14) con una de las mayores regiones 3' UTR ("untranslated region") registradas (8), tiene aproximadamente 3,360 bases adicionales y termina con una cola de 40 adeninas, siendo que el primer transcrito contiene sólo 18 nucleótidos de adenina. La causa para estas diferencias aún se desconoce, pero sugiere una selección preferencial tejido-específico de un sitio de poliadenilación o efectos también tejido-específico en la estabilidad de cada especie de mRNA. Datos de hibridación DNA-RNA tipo Northern Blot del gen IT15 y su homólogo (Rat20) en la rata han detectado también la presencia de un transcrito adicional de 12.5 Kb, que posiblemente representen un sitio de empalme ("splicing") alternativo, dando como resultado una isoforma del gen, o tal vez sea un mRNA con una mayor región 3'UTR (59).

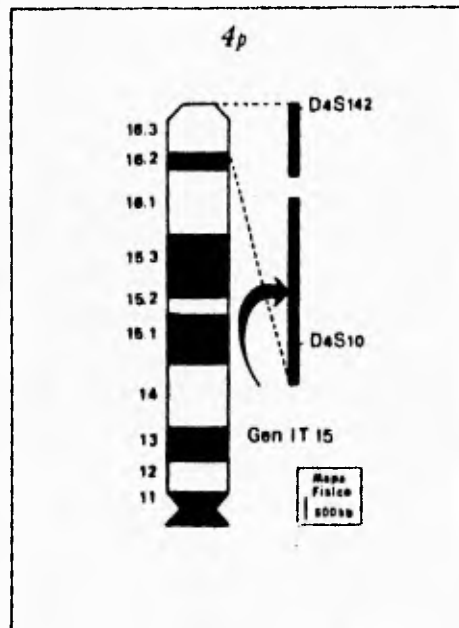


Figura 4. Esquema del brazo corto del cromosoma 4. El mapa físico del 4p16.3 se determinó mediante de análisis de ligamiento y la flecha indica la posición del gen IT15 entre los loci D4S142 y D4S10 que flanquean esta región. (Modificado de 41)

Inicialmente se reportó (34) que el gen expandido causante de la enfermedad no mostraba ninguna evidencia de sufrir inestabilidad somática al comparar diferentes tejidos de una misma persona afectada (sangre, linfoblastos y cerebro), ya que en todos se encontró el mismo número de tripletes repetidos. La amplificación por PCR de la región de los repetidos del DNA de los tejidos somáticos, muestra dos marcas intensas en las que la de mayor peso molecular representa el alelo expandido y la de menor tamaño es el alelo normal de un mismo paciente. Al migrar en electroforesis simultáneamente los amplificados de los repetidos de los distintos tejidos, las bandas obtenidas son del mismo tamaño para cada alelo, el afectado y el normal. Las electroforesis de esta región muestran un patrón de 3 a 4 pequeñas bandas muy cercanas entre sí para cada alelo y se piensa que son producto de la técnica misma de PCR y que esta ligera heterogeneidad varía un poco al cambiar las condiciones del ensayo y con la calidad del DNA (34).

En este mismo reporte de MacDonald y cols., se indica que el tamaño del expandido de un mismo paciente no varía con el tiempo ya que se compararon los amplificados del DNA de sangre fresca con los obtenidos de la extracción de DNA de sus líneas celulares establecidas de 7 a 10 años atrás, y en ambos se determinó un número igual de tripletes repetidos (34).

Otros estudios de muestras pareadas indican que la variación en el número de tripletes en una misma persona no es tan grande como entre los diferentes individuos, lo que sugiere que las diferencias entre los genes resultan de la transmisión meiótica. Este cambio en el número de copias ocurre en ausencia de recombinación (24).

Sin embargo, se ha determinado que en las células del semen de pacientes de Enfermedad de Huntington se tienen diferentes números de tripletes repetidos, es decir que existe mosaicismo dentro de las células germinales, siendo mayor a medida que el expandido aumenta en los tejidos somáticos. Esto significa que en los pacientes que presentan un alelo con una cantidad, por lo general mayor a 50 copias de (CAG)_n el mosaicismo gonadal tiene una variación de hasta casi 40 copias, en uno de los casos se informa que un paciente con 52 tripletes CAG en sus linfoblastos presentó valores que variaron de 52 a 90 repetidos en sus espermatozoides (34).

Una publicación más reciente (62) reportó haber encontrado mosaicismo de la región repetida del gen también en células somáticas de distintos tejidos de 8 pacientes. Este informe indica que de las diferentes bandas obtenidas para cada uno de los alelos la banda más intensa corresponde al alelo más frecuente, las bandas inferiores a artefactos del PCR y las superiores a amplificadas de células con un mayor número de tripletes. El hecho de que sólo el alelo expandido muestre las bandas extra por arriba de la más intensa y no así el gen normal ni los alelos de controles normales, ni que tampoco se observen al amplificar el DNA de una clona de células con un número expandido de repetidos, indica que en efecto los expandidos de los pacientes con Enfermedad de Huntington representan un mosaicismo. Con este estudio se demostró que el mosaicismo somático no es tan grande como el encontrado en las células gonadales. Es muy importante el hecho de que los tejidos con la mayor variabilidad son aquellos involucrados con una mayor muerte neuronal. Se indica que de las diferentes zonas del cerebro que fueron estudiadas, el ganglio basal y la corteza cerebral son las que muestran el mayor grado de variabilidad, y la corteza cerebelar es la que menos heterogénea se presenta. Por otro lado se ha observado que el cerebro juvenil presenta el mismo patrón de mosaicismo pero con valores exagerados. En ambos casos las mayores expansiones las muestran las células gliales y

debido a que el cerebelo tiene predominio de neuronas sobre las células gliales (mayor de 10:1) el alelo de menor tamaño está poco representado, provocando que no sea detectado en esta región. El análisis de la sangre y del hígado reveló valores intermedios. Al igual que con el mosaicismo gonadal, se observa que las mayores variaciones se presentan en aquellos pacientes con los mayores expandidos, sin embargo ésta no es tan grande ya que las diferencias van de 8 a 13 repetidos de más con respecto a la banda más intensa (62).

El producto del gen IT15 es una proteína hasta el momento no identificada, pero llamada provisionalmente huntingtina, estimándose a partir de la secuencia del DNA, que contenga 3144 aminoácidos y un peso de 480 KDa. A excepción de la región de los repetidos, la secuencia del DNA del gen IT15 no detecta ninguna similitud con ningún gen previamente reportado en la base de datos del GenBank, sólo las regiones de poliglutamina y poliprolina cercanas al extremo amino terminal son semejantes a un gran número de proteínas que contienen también estos aminoácidos, mientras que la secuencia aminoácida restante no tiene ningún parecido a las proteínas conocidas, por lo que no se cuenta con ningún indicio de su posible función dentro de la célula, y sólo puede suponerse que pertenezca a la familia de las proteínas fijadoras de DNA por su secuencia en patrón de "cierre" de leucina en el residuo 1443 (24).

Debido a que el mRNA del gen IT15 se encuentra expresado tanto en personas normales como en pacientes con un gen mutado y en pacientes homocigotos para ambos alelos expandidos, se ha determinado que el trinucleótido repetido no causa la inactivación simple del gen que lo contiene, como en el caso del Síndrome X Frágil en el que un trinucleótido repetido provoca la metilación del gen y por lo tanto evita su expresión (24).

El hecho de que los pacientes heterocigotos no presenten diferencias fenotípicas con los pacientes homocigotos para la expansión, sugiere que la mutación provoca una ganancia de función, de manera que tanto el mRNA o la proteína final producto del alelo mutado pudieran tener algunas nuevas propiedades o pudieran estar siendo expresadas inadecuadamente (24). Otra hipótesis sugiere que la proteína resultante del gen mutado pudiera funcionar como multimérica, y que las subunidades defectuosas ejercieran un efecto dominante negativo, con lo que el umbral funcional de las subunidades producidas por el alelo normal se vería críticamente afectado (12).

Hasta el momento se piensa que la posición del trinucleótido repetido se encuentra en el marco abierto de lectura del mRNA, por lo que los repetidos CAG serían traducidos a su aminoácido glutamina. Esta región de poliglutaminas cercana al extremo amino

terminal de la proteína le provocaría cambios, probablemente de estructura tridimensional, que resultarían en la alteración de sus funciones. En el caso de que la traducción se lleve a cabo después del primer codón para metionina, es decir más allá del extremo 3' de los (CAG)_n, la proteína final no contendría en su secuencia primaria la región de poliglutamina. En este caso el repetido se encontraría en una región 5' UTR, por lo que entonces su efecto dominante sería llevado a cabo a nivel del mRNA. La presencia del repetido expandido debe alterar directamente la regulación, localización, estabilidad o la traducibilidad del mRNA pudiendo indirectamente afectar al gen del alelo normal de los pacientes heterocigotos (24).

Otro posible mecanismo de la mutación se refiere a que la presencia de los repetidos expandidos pudiera alterar el sitio efectivo para el inicio de la traducción del gen IT15 para un transcrito afectado, provocando la pérdida del control de la expresión del gen. Otra hipótesis sugiere que aunque el repetido se ha localizado dentro del transcrito IT15, existe la posibilidad de provocar la enfermedad debido a que participe en la regulación de la expresión de algún gen adyacente y que por causa de la expansión se vea alterada (24).

RANGOS NORMALES Y AFECTADOS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Después de la identificación de la mutación causante de la Enfermedad de Huntington por el grupo colaborativo, extensas investigaciones se han realizado en diferentes poblaciones, con el fin de verificar si la expansión del repetido (CAG)_n está presente en las personas afectadas (24).

Hasta diciembre de 1993, 1910 personas afectadas y 3585 controles normales se presentaron en el 15vo Taller Internacional de Investigación de la Enfermedad de Huntington de la Federación Mundial de Neurología (37). En este número de pacientes pertenecientes a Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Cardiff (Holanda), Alemania e Italia, se determinaron expandidos desde 27 copias CAG en el gen IT15 y hasta 121, estableciéndose un rango normal de 7 a 37 repetidos. Excluyéndose 2 casos en los que dos personas sin claros antecedentes de la enfermedad presentaron expandidos más bajos de 27 y 30 unidades, el menor tamaño más frecuentemente reportado fue de 36 trinucleótidos. Los casos juveniles variaron de 44 hasta 121 (CAG)_n. Los casos de inicio de los síntomas a los 80 y 90 años se presentaron en personas en las que se determinaron alelos con 39 y 41 repetidos respectivamente (37).

Para el caso específico de algunas poblaciones estudiadas se han determinado los siguientes rangos:

POBLACION	ALELOS NORMALES	ALELOS AFECTADOS
Alemana	11-35	40-75
Danesa	9-30	39-70
Escocesa	13-33	39-67
Reino Unido	7-34	27-102
Escocesa	8-33	35-62

En mayo de 1994 se publicó el primer trabajo de investigación extensiva del estudio del polimorfismo CAG del gen de la Enfermedad de Huntington a nivel mundial. En este estudio se determinó que la expansión del trinucleótido repetido CAG es la base molecular causante de la enfermedad en todo el mundo. Se estableció que los cromosomas normales representan una población homogénea con diferencias no significativas entre las distintas poblaciones y grupos étnicos que fueron estudiados. De igual manera el grupo afectado presenta un patrón bien definido (27).

Se han reportado casos de pacientes que habiendo sido diagnosticados de padecer Enfermedad de Huntington no presentan la expansión de sus alelos en los rangos establecidos como afectados, es decir sus 2 alelos son normales. Gusella explica que este fenómeno pudiera deberse a que tales individuos en realidad no padezcan Enfermedad de Huntington, sino otra afección que de alguna manera pudiera confundirse con ésta (24). Snell y cols. (57) indican que la falla en detectar un alelo expandido en personas afectadas pudiera reflejar algunas de las siguientes situaciones: a) fallas técnicas del PCR, b) personas normales homocigotas para 2 alelos normales, c) mal diagnóstico, d) mezcla de muestras, e) o un caso real de Enfermedad de Huntington pero sin el expandido, porque aunque otras mutaciones en el gen IT15 son poco probables, tampoco pueden ser descartadas (27). Por lo tanto, otras mutaciones en este gen o en otra secuencia que involucre la función de la huntingtina deben buscarse para aquellos casos que tienen la sintomatología pero no la expansión (66).

Otros investigadores piensan que las personas sin expansión presentan un mosaicismo en el cual el alelo mutado se encuentra mayormente representado y/o más expandido en el tejido cerebral que en la sangre que se usa para el análisis, teniendo en cuenta que el mosaicismo somático es órgano-específico y que existe de forma más importante en el Sistema Nervioso Central (excepto en el cerebelo). La ausencia de

mosaicismo extremo en tejidos como la sangre, hígado e intestinos podría deberse al alto recambio celular que presentan (62).

INESTABILIDAD DEL GEN

En prácticamente todas las publicaciones, se ha hecho referencia al fenómeno de que las mayores expansiones CAG, causantes de la Enfermedad de Huntington Juvenil son heredadas principalmente por los hijos de varones afectados. Por lo tanto fue necesario, el estudio del repetido en esperma de pacientes, encontrándose un grado variable de heterogeneidad de alelos que parece aumentar con el tamaño del alelo expandido de los tejidos somáticos (34). Por otro lado un grupo canadiense reportó (62) que la expansión del repetido en el semen indica la inestabilidad meiótica del gen, y su alta variación dentro de los espermatozoides sugeriría que la espermatogénesis por sí misma pudiera contribuir con la expansión, particularmente observada cuando el gen es transmitido de un padre afectado a su hijo y éste presente Enfermedad de Huntington de inicio temprano (6, 11, 36, 37, 45, 55, 66).

Respecto a la inestabilidad de este gen al ser transmitido por vía materna, se determinó que en el 46% de los casos, el tamaño del repetido aumenta respecto al tamaño que presenta la madre afectada, en el 15% el tamaño disminuye y en el 38% no hay cambio. En transmisiones paternas existe un claro comportamiento bimodal en el cual del 69% de los casos totales, el 45% el repetido aumenta de tamaño discretamente, en el 27% disminuye y en el restante 27% no cambia. En el otro 31% de las transmisiones paternas la expansión aumenta de forma exagerada (a casi el doble) pareciendo ser proporcional al tamaño inicial del alelo afectado del padre. Al igual que los casos de EH Juvenil, los casos nuevos o esporádicos están asociados a transmisiones paternas en las que un varón con un alelo normal y otro de tamaño intermedio o premutado (33-37 copias), provoca una inestabilidad en su descendencia, dando lugar a alelos completamente mutados en sus hijos. No se sabe si estos alelos intermedios son por ellos mismos inestables o si la mutación ocurre por un efecto de traslape del haplotipo afectado completo (12).

La transmisión de estos genes altamente inestables a través de la línea germinal paterna se ha asociado a una edad avanzada del padre (37).

Se piensa que la inestabilidad ocurre durante la gametogénesis masculina, pero es muy posible que también suceda en la ovogénesis, debido a que en menor magnitud también existe una alta frecuencia de transmisiones inestables de madres afectadas a sus hijos (34). Esta inestabilidad pudiera darse en la ovogénesis como se mencionó, pero las grandes expansiones son incompatibles con la producción de oocitos viables respecto a la producción masiva de espermatozoides (13).

Este fenómeno es evidente al determinar que la variación en la longitud del repetido CAG, entre hermanos afectados, es mucho más amplia para los alelos de origen paterno que para los maternos, encontrándose que 13 de 29 pares de hermanos, hijos de una madre afectada contenían en sus genes longitudinales CAG idénticas, en oposición a 7 de 42 pares de hermanos hijos de varones enfermos. La mayor proporción de cromosomas afectados derivados por vía paterna (16% masculinos, contra 2% femeninos), sugieren un posible efecto diferencial paterno contra la transmisión materna (57).

El hecho de que los casos transmitidos por vía paterna tengan en general grandes aumentos y provoquen la mayor parte de los casos juveniles sugiere que el gen mutado o un gen modificador presenten "impresión genética", (la impresión cromosómica o genética describe el proceso epigenético o del desarrollo que afecta la habilidad de un cromosoma o un gen de funcionar a futuro en las generaciones celulares dependiendo de su origen paterno o materno (19,29)), o que el DNA mitocondrial juegue un papel protector (58).

En el caso de los cromosomas normales, las transmisiones meióticas no han revelado cambios en el número de repetidos, ya que el análisis de muestras (6) de ambos padres y sus hijos no muestra cambio en el tamaño de los alelos heredados. En algunas familias en las que uno de los padres tiene genes intermedios, ha habido variación durante 3 generaciones, aunque la existencia de la gran cantidad de alelos normales diferentes, sugiere al menos un pequeño grado de inestabilidad (13).

El momento exacto en el cual se lleva a cabo la inestabilidad de estos genes aún es desconocido. Sin embargo, el estudio de pares de gemelos monocigóticos con Enfermedad de Huntington, probó que ambos contenían en sus células idéntico número de tripletes tanto en el alelo normal como en el expandido. Este fenómeno hace suponer que la mutación ocurre antes del evento de la formación de los gemelos (34).

Para el caso del S. X-Frágil la ausencia de la expansión completa en el espermatozoides de los pacientes hace pensar que la inestabilidad del gen sucede sólo después de la fecundación, entre el día 5 y 20 de vida fetal. Esta diferencia entre X-Frágil y Enfermedad de Huntington sugeriría que la expansión resulta de mecanismos fundamentalmente diferentes (34).

Se piensa que la inestabilidad somática debe ser específica de un tipo de células o de una región en particular, provocando la existencia de mosaicos más evidentes en zonas muy específicas del cerebro y de manera preferencial en las células gliales (62).

EDAD DE INICIO

Uno de los principales objetivos que han querido alcanzarse con el descubrimiento del gen HD, es el poder determinar el momento en que una persona que contiene el trinucleótido CAG expandido presentará los síntomas que indiquen que la enfermedad ha comenzado. A pesar de que se han obtenido muy fuertes correlaciones estadísticas, la longitud del repetido, de forma exclusiva, no es un buen factor para predecir la edad de inicio (13, 26). En la literatura aparecen edades de inicio desde los 2 años y hasta los 80, presentándose los casos más avanzados en mujeres (12). Se ha podido establecer que el sexo del padre afectado provoca la edad de inicio de su descendencia al modificar la longitud del triplete que lleva en sus células (58).

La posibilidad de predecir inicios individuales basados únicamente en el tamaño del repetido con las menores copias, es decir entre 37 y 50 tripletes, es pobre, pero la relación edad de inicio/tamaño de la expansión, aumenta con las mayores expansiones (26,58), ya que por lo general las personas con repetidos mayores a 53 copias inician la enfermedad durante los primeros 20 años de su vida (6).

La prueba de PCR para determinar si una persona tiene una expansión en sus repetidos es de gran ayuda, pero como se mencionó no permite establecer la edad de inicio, ya que se ha observado que entre personas con igual número de repetidos ha llegado a existir una diferencia de edades de inicio de hasta 15, 20 y 31 años (6), lo que indica que además de la expansión deben existir otros factores que modifiquen la progresión del padecimiento (36). Se ha sugerido que diferentes mecanismos o algún *locus* no ligado deben influir de modo que indiquen el inicio de la enfermedad (6).

Un aumento obvio de la expansión no siempre se asocia con anticipación en términos de edad de inicio, y los cambios moderados en el tamaño de la expansión del repetido no siempre están asociados con los cambios en la edad de inicio sin cambios medibles en la longitud del repetido (4).

Se ha considerado un efecto del alelo normal sobre el alelo mutado, sugiriendo que la expansión está modulada por el gen normal o por un *locus* cercanamente ligado, sin embargo no ha habido correlaciones claras entre dicho alelo normal y las edades de inicio entre hermanos que tienen valores muy parecidos del polimorfismo CAG (55).

La anticipación por transmisión paterna muestra un inicio anterior que en promedio está alrededor de los 9 años respecto a la generación anterior, mientras que en los casos maternos las diferencias son de sólo 2.5 años (57), lo que sugiere un efecto de impresión genética sexo-específico de éste *locus* (56).

Para los casos de pequeñas expansiones es posible que efectos ambientales, modificadores genéticos o procesos estocásticos tengan que ver de forma significativa en la determinación del inicio (13). Para los casos de expandidos mayores el inicio ha sido atribuido tanto a la heterogeneidad de la mutación, como a la influencia de genes alélicos y no alélicos modificadores (57).

PERSPECTIVAS

Como se ha mencionado, hasta el momento los pacientes con Enfermedad de Huntington no cuentan con una terapia que pudiera revertir la muerte neuronal para evitar la progresión de los síntomas. Sin embargo, están siendo probados algunos posibles agentes neuroprotectores como el baclofén (antiglutaminérgico) y el tocoferol (antioxidante), así como otros agentes antagonistas del NMDA, del AMPA y la glicina, y bloqueadores de los canales de calcio. Además se están evaluando potenciales trasplantes neurales con células del proceso diferenciado gangliónico lateral fetal. Se ha pensado en el uso de células de la ingeniería genética productoras de factores de crecimiento, o neurotransmisores o ambos que pudieran impedir la muerte neuronal o restaurar el tejido dañado. También se está probando el enmascaramiento de los antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) que permita trasplantes transgénicos (37).

2. OBJETIVOS

1. Reunir 100 muestras de sangre para la extracción de DNA de controles normales para el estudio del gen de la Enfermedad de Huntington.
2. Determinar si las muestras reunidas son representativas de la población mexicana, mediante el análisis de marcadores genéticos eritrocíticos y haptoglobinas.
3. Utilizando la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) radiactiva, y por autorradiografía, determinar los diferentes alelos del gen IT15 en los 100 controles, así como su frecuencia. Calcular también la frecuencia de homocigotos y heterocigotos para este gen.
4. Realizar por la técnica de PCR, el diagnóstico definitivo a los individuos afectados en una familia, y el diagnóstico predictivo a las personas en riesgo de la misma familia.
5. Establecer si existe una correlación entre el número de tripletes CAG repetidos y la edad de inicio, tal y como se ha reportado en otras poblaciones.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La estrategia experimental para la realización de este trabajo consistió en lo siguiente:

a) Selección de la muestra para el estudio del gen mediante el análisis de marcadores genéticos de poblaciones.

b) Estudio directo del polimorfismo CAG del gen IT15 mediante la técnica de PCR.

A) MARCADORES GENETICOS.

Para establecer la muestra de población mexicana normal para el estudio del gen IT15, se decidió medir biológicamente a cada control mediante el análisis de sus marcadores genéticos eritrocíticos y haptoglobinas.

SISTEMAS SANGUINEOS.

Los métodos usados para demostrar la existencia de los diferentes grupos sanguíneos emplean técnicas inmunológicas basadas principalmente en la detección de los antígenos eritrocíticos mediante su reacción con anticuerpos específicos. La positividad de la reacción antígeno-anticuerpo produce el fenómeno de aglutinación de los glóbulos rojos, que habitualmente puede ser observada a simple vista en portaobjetos o tubos de ensayo. Estas pruebas de aglutinación se describen detalladamente más adelante, para los sistemas ABO, MN, Fy y Rh-Hr (31).

HAPTOGLOBINAS

La haptoglobina es una α -2-glicoproteína que forma complejos con la hemoglobina libre en el plasma. Puede presentarse en tres fenotipos en la población: Hp1.1, Hp2.1 y Hp2.2. Los genotipos correspondientes pueden determinarse mediante electroforesis en gel de almidón (31).

B) POLIMORFISMO DEL GEN IT15

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), es un método enzimático por el cual pueden ser producidos *in vitro*, segmentos específicos de DNA (14).

Por medio de este proceso a partir de una copia de DNA molde, es posible, al final tener 10^8 veces más copias del fragmento requerido, a este proceso se le ha llamado amplificación del DNA (5, 14, 30, 47).

Mediante PCR, la DNA polimerasa lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria de DNA en la dirección 5' a 3', teniendo como molde DNA de doble cadena. Esta técnica requiere además del molde dos oligonucleótidos sintéticos (conocidos como iniciadores) que son diseñados de tal modo que por su estructura hibriden específicamente y en la orientación adecuada (5' a 3') con la secuencia de interés del molde, dando de esta forma lugar a la pequeña región de doble cadena inicial que la DNA polimerasa necesita (5).

Los iniciadores hibridarán con el molde de manera que la extensión del primero por la DNA polimerasa conduzca la síntesis hacia el segundo. Así el iniciador 1 dirigirá la síntesis de una cadena de DNA que podrá posteriormente ser hibridada por el iniciador 2 y viceversa. El resultado es la síntesis *de novo* de una región flanqueada por cada uno de los iniciadores (figura 5).

Debido a que inicialmente se debe desnaturalizar el DNA a alta temperatura ($>90^{\circ}\text{C}$), actualmente se usa una DNA polimerasa termoestable, cuya temperatura óptima de actividad se encuentra entre los 70 y 75°C. Esta enzima se obtiene de la bacteria *Thermus aquaticus*, y gracias a que resiste los cambios de temperatura que se llevan a cabo durante el proceso, no es necesario añadirla en cada ciclo, como inicialmente se hizo con el fragmento Klenow termolábil de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*. Otra ventaja del uso de esta enzima termoestable (Taq DNA polimerasa) se refiere a su actividad a altas temperaturas a las que la alineación de los iniciadores es más específica y la síntesis de DNA es más rápida (14).

Los requerimientos de la reacción de PCR son: deoxinucleótidos (dNTP's) que proveen tanto la energía como los nucleósidos para la síntesis de la nueva cadena, Taq

PCR

- 1 Desnaturalización
- 2 Hibridación de cada iniciador
- 3 Polimerización
- 4 Repetición del ciclo

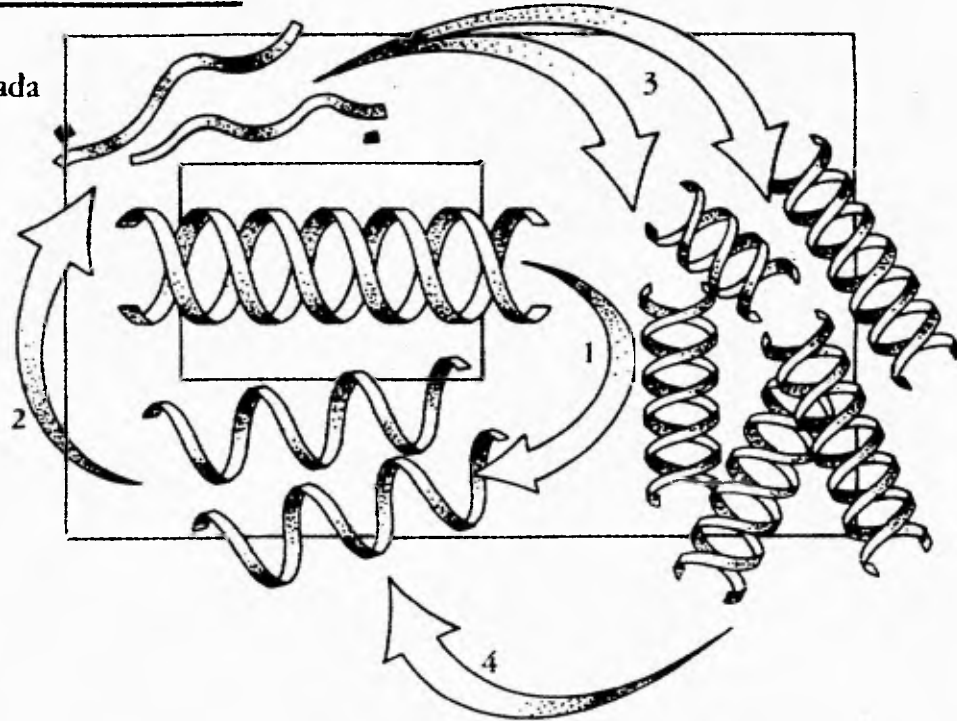


Figura 5. Técnica de PCR. Este esquema representa las diferentes etapas del proceso: 1. Desnaturalización del molde de DNA de doble cadena. 2. Alineamiento o hibridación de los iniciadores con su secuencia blanco. 3. Polimerización de la cadena complementaria al molde por la Taq DNA polimerasa, y 4. Inicio de un nuevo ciclo con la desnaturalización de las nuevas cadenas. (Modificado de 47)

DNA polimerasa, el par de iniciadores, el DNA molde y el amortiguador de reacción con Mg^{2+} .

Los dNTP's y los iniciadores deben adicionarse a la mezcla de reacción en gran exceso, ya que son requeridos al principio para la síntesis de la cadena nueva que se llevará a cabo más allá de la secuencia complementaria al otro iniciador (figura 6), y además porque con cada ciclo de calentamiento y enfriamiento la región flanqueada por cada uno se incrementa de manera exponencial. Los fragmentos más grandes generados por las grandes cadenas de DNA molde se acumularán de forma lineal, por lo que al finalizar los ciclos, el producto predominante será el fragmento de DNA flanqueado por los iniciadores y por ellos mismos.

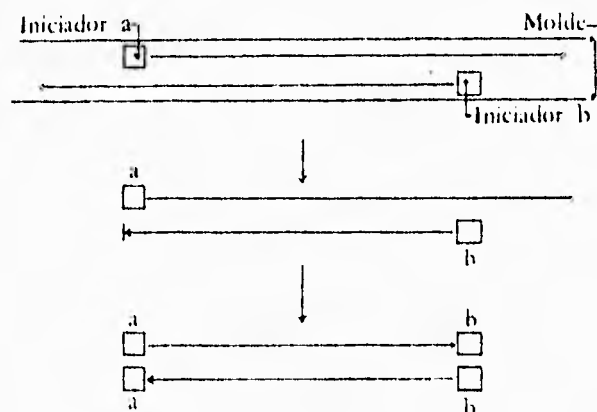


Figura 6. La polimerización inicial de la cadena complementaria nueva se lleva más allá de la secuencia del iniciador a. En los ciclos subsiguientes la polimerización se ve restringida al tamaño de las cadenas nuevas, dando un producto de tamaño discreto que contiene también la secuencia de los iniciadores a y b. (Modificado de 5)

En cada ciclo del proceso debe elevarse la temperatura hasta 90-95°C para la desnaturalización del DNA genómico de doble cadena que será usado como molde. Una vez separadas las cadenas del molde, la temperatura debe ser aquella en la cual los iniciadores hibriden específicamente con su blanco; por lo general esta temperatura se encuentra alrededor de los 60°C o más dependiendo del contenido de bases C+G y del tamaño de los iniciadores. Para la polimerización de la cadena complementaria al molde, la Taq DNA polimerasa requiere de aproximadamente 72°C. De esta forma en cada ciclo debe elevarse la temperatura a más de 90°C, después bajar aproximadamente a 60°C y

nuevamente subir a 72° y así sucesivamente, durante 20 o más ciclos dependiendo de la reacción.

Se recomienda que para iniciar se mantenga durante aproximadamente 5 minutos la temperatura a más de 90°C para lograr la desnaturalización completa del DNA molde. Para asegurar la actividad máxima de la enzima, se aconseja adicionarla después de este tiempo de desnaturalización. Al término de los ciclos es aconsejable dar un tiempo similar de 5 min para permitir que la DNA polimerasa complete la síntesis de los productos que hubieran quedado sin terminar (47).

COMPONENTES DE LA MEZCLA DE REACCION

DNA POLIMERASA: la enzima más usada es la Taq DNA polimerasa, sin embargo pueden usarse las polimerasas aisladas de *Thermus thermophilus*, *Bacillus stercorophilus*, y la Vent polimerasa aislada del *Thermococcus litoralis* que además posee actividad de corrección de lectura (47).

La Taq DNA polimerasa tiene actividad de 65 a 75°C, y su pH óptimo está entre 8.2 y 9.0 en Tris 10 mM (a 25°C), a pH's mayores o menores su actividad disminuye (47).

MEZCLA DE REACCION: las condiciones y componentes de la mezcla varían de una reacción a otra, sin embargo puede decirse que deben tener en concentraciones finales: Tris 10 mM pH=8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, gelatina 0.01%, NP40 0.01% y Tween 20 0.01% o Tritón X-100 0.01%, con el fin de obtener la mayor procesividad de la enzima. Algunas veces con altas concentraciones de dNTP's se requiere de una mayor concentración de Mg (+2) debido a que éstos se unen aparentemente, de forma estequiométrica con el magnesio. Este amortiguador es estable a -20°C (47).

INICIADORES: se sintetizan de forma complementaria a la cadena molde por amplificar, con tamaños que van de 18 a 30 bases generalmente. Para DNA poco complejo (por ejemplo de plásmidos) son de menor tamaño. La secuencia de los iniciadores debe tener un contenido similar de bases C+G; y deben diseñarse de manera que formen las mínimas estructuras secundarias posibles, para evitar la autocomplementariedad y baja complementariedad entre ellos, particularmente en su región 3'. Se ha observado una temperatura de alineamiento de aproximadamente 60°C para iniciadores de 24 a 30 bases;

actualmente existen programas especiales para el diseño y determinación de las características de éstos (47).

DNA MOLDE: puede usarse el DNA obtenido de diversas formas, pero el principal requerimiento es que debe estar intacto en la secuencia por amplificar, por lo que de DNA muy degradado solamente los fragmentos más cortos son los que podrán analizarse. Deben evitarse los inhibidores de la reacción, tales como los detergentes, EDTA, fenol, etc. usados al momento de la extracción (5, 47).

La selección de tiempos, temperaturas y número de ciclos dependerá del DNA por amplificarse y de los iniciadores escogidos. De igual manera, el volumen final de reacción se determina para cada caso, pero en general se encuentra entre 10 y 100 microlitros, dependiendo de los análisis posteriores de la muestra (47).

Los tiempos de incubación deben ser lo más cortos posible para disminuir el tiempo total del proceso y evitar, de esta forma, amplificaciones inespecíficas. Se considera que para calcular el tiempo de extensión debe darse aproximadamente un minuto por kilobase de DNA blanco y 2 minutos por kilobase para la extensión final (47).

Los productos de PCR son fragmentos de tamaño definido y su análisis se lleva a cabo tomando una pequeña alícuota del amplificado y analizándolo en electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, de forma paralela a un marcador de peso molecular adecuado. Las bandas de peso específico generadas pueden verse bajo luz ultravioleta (UV) en geles de agarosa, o mediante autorradiografía en el caso de usar reactivos marcados con isótopos radiactivos en geles de poliacrilamida. Los productos pequeños de DNA y los iniciadores mismos pueden ser vistos como bandas difusas cerca del frente de corrimiento del gel, pero el producto principal se observa como una banda intensa del tamaño esperado. Pueden observarse también bandas adicionales debido a la alineación no específica de los iniciadores (5, 47).

USO DEL PCR EN LA INVESTIGACION DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Inicialmente los análisis de ligamiento realizados para el diagnóstico de la Enfermedad de Huntington, requerían del seguimiento de los marcadores genéticos ligados a RFLP's, por lo que era necesario amplificar por PCR una pequeña región de DNA cercano al sitio de restricción de interés, y posteriormente el producto obtenido era

expuesto a la enzima adecuada, y después de la digestión era analizado en gel o mediante la técnica de hibridación DNA-DNA tipo Southern (35, 64).

Actualmente con el descubrimiento del gen responsable del padecimiento, es posible realizar el diagnóstico de la Enfermedad de Huntington, amplificando por PCR la región de trinucleótidos repetidos, y su posterior análisis al correr el producto en geles desnaturalizantes de poliacrilamida junto a un marcador de peso molecular. Debido a que el PCR lleva entre sus componentes dCTP marcado con fósforo radiactivo [^{32}P], la banda obtenida puede ser leída directamente de la placa de rayos X, después de la autorradiografía.

En la publicación de Cell de marzo de 1993 (24), se dio a conocer la secuencia del gen IT15, y las condiciones de PCR para amplificar los repetidos que contiene cerca de su extremo 5'. Los iniciadores publicados hibridan específicamente 30 pb antes de la zona repetida, el primero; y después de 133 bases más que no son CAG repetidos, el segundo hibrida con 30 bases más. Por lo que el producto final es un fragmento de 193 pares de bases más aparte de los repetidos. Un cromosoma que contenga 15 tripletes CAG, al ser amplificado usando éste par de iniciadores dará un producto de $(15 \times 3) + 193 = 238$ bases, que puede ser comparado con el marcador de peso molecular.

En este reporte de Cell (24), la secuencia de cDNA del gen IT15 muestra el primer repetido a 366 pares de bases de inicio del gen, y casi inmediatamente después (6 pb más) se encuentra una secuencia CCG que se repite 7 veces. El ensayo de PCR reportado en este artículo utiliza dos iniciadores de 30 pb cada uno (su secuencia se da más adelante). Este par de iniciadores flanquean los repetidos CAG, así como también el tramo siguiente CCG, lo que en ocasiones provoca dificultades para la amplificación debidas al alto contenido de bases C+G de esta zona.

Debido a que en un principio se pensó que el tramo de tripletes CCG no variaba, la prueba de PCR con los iniciadores mencionados, daba el número de exacto de repetidos CAG, al realizar los cálculos correspondientes. Algunos grupos europeos y norteamericanos reportan tener problemas con una adecuada amplificación de los repetidos, por lo que se han tenido que realizar modificaciones para mejorar el ensayo. Una publicación (63) dio a conocer que mediante un PCR no radiactivo y detección del producto en agarosa, las amplificaciones resultan eficientes, pudiendo ser visualizadas, con tinción de bromuro de etidio, aún las expansiones más grandes. Este método además de evitar el uso de radiactividad, permite resultados mucho más rápidos que con la

autorradiografía. Otro grupo danés reportó (49) que al amplificar con los iniciadores del grupo colaborativo, aparecía siempre un producto de amplificación que parcialmente cubría los fragmentos esperados, por lo que desarrollaron nuevos iniciadores y condiciones diferentes de PCR, que dan como resultado un fragmento 86 pb menor al original y que excluye el tramo CCG inmediato al repetido CAG.

Estudios posteriores del repetido CCG únicamente, han demostrado (52) que existe un ligero polimorfismo en esta secuencia. Este trinucleótido muestra una heterocigidad aparente del 71% en la población normal y del 40% en la afectada. Los alelos más frecuentes son los de menor y los de mayor tamaño, que varían en 9 pb, es decir en 3 repetidos. Este hecho debilita la prueba inicial debido a la posibilidad de calcular erróneamente por 3 repetidos. Se ha recomendado usar para este ensayo los iniciadores HD344 o HD3 (5' CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC 3') y HD482 o HD4 (5' GGCTGAGGAAGCTGAGGAG 3') (4,22) que permiten el cálculo en personas cuyos alelos se encuentren entre los límites superior normal e inferior afectado (figura 7).

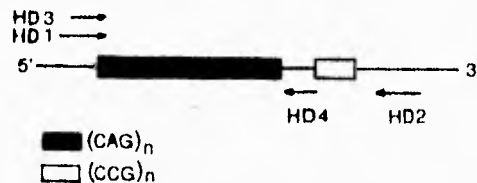


Figura 7. El par de iniciadores HD1 y HD2 usados en este estudio abarcan la región CAG repetida, así como la CCG inmediata a ésta tal y como lo indican las flechas grandes. Se ha recomendado utilizar los iniciadores HD3 y HD4 que evitan la zona polimórfica CCG, para personas con alelos premutados. (Modificado de 22)

Este polimorfismo CCG ha complicado la definición absoluta del mayor valor normal y el menor expandido y el traslape entre ellos. El único estudio largo llevado a cabo con iniciadores que amplifican específicamente el repetido CAG, reporta que la diferencia en los valores normales y afectados es de tan solo dos unidades, 33 el máximo normal y 35 el menor gen mutado.

Para la determinación del polimorfismo CAG del gen IT15 en nuestra población se

realizó el ensayo de PCR con los iniciadores HD1 y HD2 reportados por el grupo colaborativo (24).

MARCADOR DE PESO MOLECULAR

En la determinación del número de tripletes (CAG) de las muestras amplificadas, algunos autores han comparado el tamaño de los alelos con cósmidos que contienen 18 repetidos CAG (L191F1), para los alelos normales, y el cósmido GUS72-2130 que contiene 48 repetidos para la comparación de los alelos afectados (24, 34). Otros investigadores realizan sus experimentos comparando con el marcador M13 (12), y algunos más comparan con alguna secuencia conocida (15, 49).

Para la determinación del peso molecular, en este trabajo, el tamaño de la banda más intensa fue comparado con el peso molecular de la secuencia conocida del plásmido pBSMB que contiene un inserto de 736 pares de bases del gen de la Taq DNA polimerasa.

La secuenciación de este fragmento se lleva a cabo mediante el método modificado de Sanger (46, 53), que requiere básicamente del uso de terminadores específicos del crecimiento o elongación de la cadena de DNA: los 2',3'-dideoxynucleótido-5'-trifosfatos (ddNTP's). Estos ddNTP's análogos pueden ser incorporados por la DNA polimerasa a la cadena en crecimiento a través de sus grupos 5' trifosfato. Sin embargo, debido a que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3', no pueden formar el enlace fosfodiéster con el siguiente dNTP entrante (46, 53), por lo tanto la extensión de la cadena termina cada vez que un análogo es incorporado. De esta forma, cuando un ddNTP específico se incluye además de los 4 dNTP's requeridos normalmente para la síntesis de DNA, el producto es una serie de cadenas de DNA de longitudes discretas que han sido específicamente terminadas en el residuo dideoxi. Para obtener la secuencia, una reacción de extensión debe realizarse para cada uno de los 4 ddNTP's. Cuando se analizan individualmente, estas reacciones dan la información de la terminación de la cadena específica y cuando son combinadas, las 4 reacciones dan la secuencia completa.

El protocolo de secuenciación combina la alineación y la extensión del iniciador secuenciador con la reacción de la terminación de la extensión por la incorporación de los ddNTP's. Las temperaturas de incubación son de 95°C para la desnaturalización, y 68°C para la alineación del iniciador de la extensión y la terminación. La extensión es terminada tanto por la adición de un ddNTP o por el comienzo del nuevo ciclo. La incorporación al

4. MATERIAL Y METODOS

DETERMINACION DE GRUPOS SANGUINEOS

REACTIVOS

Sueros hemotipificadores Ortho anti A-B, anti A y anti B humanos.

Sueros hemotipificadores Ortho anti Rho, anti E, anti e, anti C y anti c humanos.

Sueros hemotipificadores Ortho anti M y anti N humanos.

Suero hemotipificador Ortho anti Fya humano y suero anti IgG de conejo.

SISTEMA ABO

Se mezclaron, por separado, una gota de sangre total y una gota de cada suero anti A, anti B y anti A-B en un porta objetos. Se observa la aglutinación de los glóbulos rojos. La aglutinación macroscópica de las células con cualquiera de los antisueros indica el antígeno presente en ellas y por lo tanto el grupo correspondiente. El grupo O no provoca aglutinación con ninguno de los sueros.

SISTEMA Rh-Hr

Para la determinación del antígeno D se mezcla una gota de sangre total con una gota de suero anti Rho en un portaobjetos y se observa la presencia de aglutinación de las células; en el caso de que ésta no se presente se incuba durante un minuto a 37°C, si después de este tiempo tampoco hay reacción se indica prueba negativa.

Los restantes antígenos de este sistema (E,e,C,c) se determinan por reacción en tubo. Se prepara una suspensión de glóbulos rojos del 3 al 5% en solución salina isotónica (NaCl 0.85%). En diferentes tubos de colocan cada uno de los sueros comerciales y después una gota de la suspensión de células. Se mezcla perfectamente y se centrifuga a 1000 rpm durante un minuto. Mediante agitación suave se resuspenden las células y se observa la presencia de aglutinación. En caso negativo se incuba a 37°C por 15 minutos. Después de este tiempo se centrifuga nuevamente un minuto a 1000 rpm, y con agitación suave se verifica la existencia de aglutinación. La reacción positiva indica la presencia del antígeno en las células.

SISTEMA MN

Determinación en tubo de ensaye: se prepara una suspensión al 2% de glóbulos rojos previamente lavadas en solución salina isotónica. Se coloca una gota de cada anti suero en dos tubos diferentes y se adicionan dos gotas de la suspensión de células a cada uno. Después de mezclar perfectamente se mantienen a temperatura ambiente por 30 minutos. Pasado este período las células se resuspenden por agitación suave y se examina macroscópicamente la presencia de aglutinación. La reacción positiva indica la presencia del antígeno en la membrana de las células.

SISTEMA DUFFY

Se prepara una suspensión de glóbulos rojos al 5% en solución salina isotónica. Se coloca una gota del suero anti Fya en un tubo de ensaye y se adiciona una gota de la suspensión de células mezclando perfectamente. Se incuba a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente se lavan las células con los anticuerpos unidos, con solución salina isotónica tres veces. Se adicionan 2 gotas de suero anti IgG de conejo. Después de mezclar se centrifuga un minuto a 1000 rpm. Se resuspenden las células por agitación suave y se examina la presencia de aglutinación. La prueba positiva indica la presencia de los anticuerpos unidos al antígeno Fya de las células.

ELECTROFORESIS DE HAPTOGLOBINAS REACTIVOS

*Amortiguador para Gel:

Trizma base	76 mM
Acido Cítrico	5 mM
ajustar el pH a 8.65	

*Amortiguador de Electroforesis:

Acido Bórico	0.3 M
NaOH	50 mM
ajustar el pH a 8.5	

*Colorante para Haptoglobinas:

Bencidina	0.4 g
Acido Acético	50 ml
H ₂ O ₂	3 gotas
Agua destilada	150 ml

PREPARACION DEL GEL

En un matraz kitasato de 1000 ml se colocan 28 g de almidón hidrolizado, 100 ml de amortiguador para gel y 100 ml de agua destilada, y se disuelve por agitación y aplicación de calor. Se eliminan las burbujas por medio de vacío, y con una gasa en la boca del matraz se vierte el almidón en el molde del gel previamente engrasado con vaselina. Se permite que solidifique 30 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos en refrigeración.

HEMOLISADO

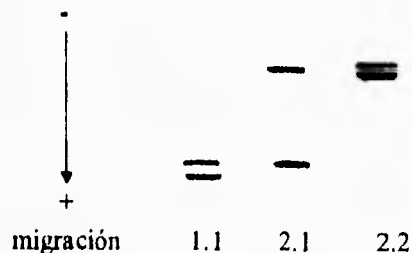
Este sirve como fuente de hemoglobina y se prepara con glóbulos rojos de la muestra por analizar o de cualquiera otra. Se elimina el plasma por centrifugación y las células rojas son lavadas 3 veces en solución salina isotónica. A este paquete globular se le adicionan volúmenes iguales de agua destilada y tetracloruro de carbono. Se mezcla con fuerza y después se centrifuga a 5000 rpm por 10 minutos. Este hemolisado a -20°C dura una semana.

PREPARACION DE LA MUESTRA Y ELECTROFORESIS

En un tubo de ensaye se colocan 2 gotas de suero o plasma por analizar y una gota de hemolisado. Se impregna bien un pequeño papel filtro Whatman N° 3 y se elimina el exceso de muestra. Después se coloca dentro del gel cortado en tres fragmentos. El gel se coloca dentro de la cámara de electroforesis y se corre en cuarto frío durante 5 o 6 hrs a 20 mA.

TINCION

Después de la electroforesis el gel debe cortarse sagitalmente y tñirse en la obscuridad con colorante de bencidina durante 10 minutos. Después de este tiempo se observará cualquiera de los siguientes fenotipos (31):



EXTRACCION DE DNA

REACTIVOS

*Amortiguador de Lisis de Glóbulos Rojos (RCBL) solución de trabajo:

Tris pH= 7.6	10 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

*Amortiguador de Lisis de Glóbulos Blancos solución de trabajo:

Tris pH= 7.6	10 mM
EDTA pH= 7.8	10 mM
NaCl	50 mM
SDS	2%
Proteinasa K	200 µg/ml

LISIS DE GLOBULOS ROJOS

Se toman aproximadamente 20 ml de sangre periférica tanto de los controles como de los pacientes, en tubos Vacutainer con anticoagulante ACD que preserva las células durante más tiempo ya que contiene dextrosa (47).

En tubos Falcon de 50 ml se mezcla la sangre total con 25 ml de amortiguador de lisis de células rojas (RCBL) y se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C (BECKMAN). Al botón de células blancas se le realizan otros tres lavados sucesivos hasta que la mayor parte de hemoglobina sea removida.

El botón obtenido puede mantenerse en refrigeración a -20°C no más de un mes.

LISIS DE GLOBULOS BLANCOS Y EXTRACCION FENOL-CLOROFORMO

Se resuspende el botón de células blancas en 1 ml de RCBL, se agregan 5 ml de amortiguador de lisis de células blancas a través de membranas Millipore de 42 micras. Esta mezcla se incuba durante toda la noche a 42°C (temperatura óptima de la Proteinasa K) con agitación (47).

Al final de la incubación se realiza la extracción con aproximadamente 5 ml de fenol saturado primero, 5 ml de solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 respectivamente) y una extracción final con 5 ml de solución cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1), agitando suavemente durante 10 minutos y centrifugando por 10 minutos a 4°C y 5000 rpm después de cada mezcla. La fase acuosa se recupera en un tubo limpio y se le adicionan aproximadamente 25 ml de etanol absoluto a 4°C para precipitar el DNA. Este precipitado es secado al aire y resuspendido en 500 µl de agua inyectable estéril.

MICROEXTRACCION CON SALES Y FENOL-CLOROFORMO

Después de la lisis de glóbulos rojos (como se explicó antes) de 7 ml de sangre, al botón obtenido se le adicionan las siguientes sales y detergentes para la lisis de las células blancas: 886 µl de NaCl 5 mM, 46 µl de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10%, agitando en vórtex, y finalmente 46 µl de solución de NaCl saturada. Se centrifuga en microcentrifuga Eppendorf a 15 000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante es extraído de la misma manera con fenol saturado, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y cloroformo/alcohol isoamílico, que en el procedimiento anterior pero adicionando 700 µl aproximadamente en cada paso. Al final de las extracciones el DNA se precipita con 500 µl de alcohol isopropílico a 4°C.

Para resuspender el DNA, primero se centrifuga para formar una pequeña pastilla, se decanta el alcohol isopropílico y la pastilla se lava 2 veces con etanol al 70% a 4°C. Se disuelve finalmente en 300 µl de agua destilada estéril.

El uso de uno u otro método depende del volumen de sangre con el que se cuenta.

CUANTIFICACION DE DNA EN GELES DE AGAROSA

REACTIVOS

*Amortiguador TBE (Tris-HCl, Acido Bórico, EDTA)

Solución 5x	Trizma base	0.45 M
	Acido Bórico	0.45 M
	EDTA pH = 8	0.5 M

Para preparar la solución 0.5x se toman 50 ml de la solución 5x y se aforan a 500 ml.

Para cuantificar y determinar la integridad del DNA se toman 4 μ l de DNA perfectamente disuelto y se mezclan con 3 μ l de colorante de carga (glicerol en agua al 30%, azul de bromofenol 0.25% y cianol-xileno FF 0.25%) a 4°C, y se analizan en electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x, a 80 volts iniciales y después 100 volts por 50 minutos más. Como marcador de peso molecular se usan 2 μ l de DNA Lambda-Hind III (Boehringer Mannheim) más 2 μ l de colorante de carga.

Después de la electroforesis el gel se tiñe con bromuro de etidio durante un minuto. Posteriormente se fotografian los geles con una cámara Polaroid DS-34 y filtros Kodak rojo R1 y ámbar, bajo luz UV en un transiluminador Cole Parmer con exposición de un minuto y asa 8B.

TRATAMIENTO DE DNA DEGRADADO CON GENE CLEAN

Algunas muestras de DNA que en geles de agarosa se notan demasiado degradadas, se limpiaron con GeneClean II Kit de BIO 101 de la siguiente forma: a una alícuota de aproximadamente 150 μ l de DNA degradado se agregan 3 volúmenes (450 μ l) de NaI (yoduro de sodio), y se incuba entre 45 y 55°C durante 5 minutos. Después se agregan 5 μ l/ 5 μ g o menos de DNA. Se agita suavemente y se centrifuga 5 segundos a 12 000 rpm. Se lava 3 veces con solución New Wash (centrifugando y decantando cada vez). Finalmente la pastilla que se obtiene es lavada con 50 μ l de agua inyectable estéril 2 veces, pero en este caso los sobrenadantes que contienen al DNA limpio se recogen en un tubo Eppendorf de 0.5 ml estéril y las perlas se desechan.

Para comprobar que después del tratamiento el DNA queda limpio, se determina la relación de absorbancias a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro BECKMAN, y se analiza una alícuota de 3 μ l en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x.

PCR DEL REPETIDO (CAG)_n DEL GEN IT15

Una vez cuantificado el DNA se toman de 1 a 5 μ l por muestra para el ensayo de PCR, dependiendo de qué tan concentrado se encuentre, para tener una concentración final aproximada de 200 ng.

Los iniciadores usados para la amplificación de la región específica de los repetidos CAG son los reportados en el artículo del Grupo Colaborativo (24):

HD1-083 5' ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TTC 3'
HD2-084 5' AAA CTC ACG GTC GGT GCA GCG GCT CCT CAG 3'

La amplificación se realizó en un termociclador modelo DNA Thermal Cycler de Perkin Elmer Cetus, bajo las siguientes condiciones:

5 minutos de desnaturalización a 94°C
40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto
 alineación de los iniciadores a 60°C por 1 minuto
 polimerización a 72°C por 2 minutos
5 minutos de extensión final
5 minutos a 4°C.

La amplificación fue realizada en un volumen final de 25 µl usando 200 ng de DNA genómico; 1 µg de cada iniciador (Genosys Biotech); 2.5 µl de amortiguador 10x de Tris pH= 8.3 10 mM, KCl 5 mM y MgCl₂ 2 mM; 1 µl de cada dNTP 10 mM, DMSO (dimetil sulfóxido) al 5%; 1 µCurie de α-[³²P]-dCTP (Redivue Amersham); y 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa (Boehringer Mannheim, GIBCO BRL y AmpliTaq de Perkin Elmer).

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

REACTIVOS

Solución Concentrada de Acrilamida al 40%:

a)	acrilamida	38.67 g
	bisacrilamida	1.33 g
	H ₂ O cbp	100 ml

Primero se adicionan 50 ml para que se disuelvan y después se afora hasta 100 ml. La solución se agita en un matraz protegida de la luz, cubriendo con papel aluminio.

b) agregar 2.5 gramos de perlas de amberlita y agitar durante una hora para desionizar. Posteriormente la solución se filtra en papel Whatman y se almacena a 4°C protegida de la luz.

PREPARACION DEL GEL

Los geles de poliacrilamida al 6% y desnaturalizantes con urea 7 M se preparan de la siguiente forma:

Acrilamida al 40%	4.5 ml	16.5 ml
TBE 10x	3.0 ml	11.0 ml
Urea	12.6 g	46.2 g
Agua destilada	13.5 ml	49.5 ml
Persulfato de amonio al 10%	250 μ l	900 μ l
TEMED	18 μ l	75 μ l
	<hr/>	<hr/>
	30.0 ml*	110 ml**

* para geles de 16x19 cm

** para geles de 35x43 cm

Después de la electroforesis el gel se transfiere a un filtro Whatman 3MM Chr para secarse a 80°C durante una hora en un secador de vacío E-C.

SECUENCIACION DEL PLASMIDO

Como marcador de peso molecular se usó la secuencia del fragmento del gen de la enzima Taq polimerasa contenido en el plásmido pBSMB. Los componentes del estuche comercial (Amplitaq Cycle Sequencing Kit de Perkin Elmer Cetus) para realizar la secuenciación de este fragmento contienen:

*Amortiguador Cycling Mix 10x 500	(Amplitaq DNA polimerasa 0.5 U/ μ l, Tris HCl mM pH= 8.8, KCl 500 mM, MgCl ₂ 25 mM)
*G Termination Mix con 7-deaza-dGTP	(c7-dGTP 40 μ M, dATP 20 μ M, dTTP 20 μ M, dCTP 20 μ M, ddGTP 120 μ M)
*A Termination Mix con 7-deaza-dGTP	(c7-dGTP 40 μ M, dATP 20 μ M, dTTP 20 μ M, dCTP 20 μ M, ddATP 800 μ M)

*T Termination Mix con 7-deaza-dGTP	(c7-dGTP 40 μ M, dATP 20 μ M, dTTP 20 μ M, dCTP 20 μ M, ddTTP 1200 μ M)
*C Termination Mix con 7-deaza -dGTP	(c7-dGTP 40 μ M, dATP 20 μ M, dTTP 20 μ M, dCTP 20 μ M, ddCTP 400 μ M)
*pBSMB Sequencing Control	(pBSMB 10 nM en EDTA 0.1 mM, Tris HCl 10 mM pH = 8.0)
*Stop Solution	(formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05%, cianol-xileno FF 0.02%)

La mezcla de reacción para el PCR se preparó como sigue:

Agua Inyectable Estéril	10.0 μ l
α -[³² P] dCTP	1.25 μ l
Amortiguador Cycling Mix 10x	5.0 μ l
DNA molde (pBSMB)	6.5 μ l
Iniciador Forward	1.25 μ l
Taq DNA Polimerasa (5U/ μ l)	1.25 μ l
	<hr/>
	25.00 μ l

A 4 tubos para PCR se adicionan 4 μ l de cada terminador ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP respectivamente, y después se les adiciona a cada uno 5 μ l de la mezcla anterior. Para evitar la evaporación se adicionan además 8 μ l de aceite mineral sobre la reacción final.

Inicialmente están reportados volúmenes menores de cada reactivo de la mezcla para un total de 20 μ l, pero estos volúmenes se calcularon para 5 reacciones (25 μ l) debido a que muchas veces el volumen va perdiéndose al manipular los reactivos por lo que el último tubo de los terminadores quedaba con menos mezcla, provocando que en la secuencia solamente se observaran las bandas correspondientes a las bases que tuvieron el volumen adecuado de reactivos. También se adicionó Taq DNA polimerasa extra para definir más las bandas.

Una vez realizada la mezcla de reacción, los tubos se someten a 20 ciclos de 95°C un minuto para la desnaturalización, y 68°C un minuto para la alineación del iniciador y la extensión hasta la incorporación de los ddNTP's. Al finalizar este PCR, se adiciona a cada tubo 4 µl de solución de paro (Stop Solution), y se guarda en el congelador a -20°C. Este producto solamente dura una semana.

5. RESULTADOS

Se estudiaron las muestras de 137 donadores del Banco de Sangre del INNN, sin antecedentes de Enfermedad de Huntington, es decir personas normales para el estudio de los diferentes alelos de gen IT15 responsable del padecimiento. Tales controles normales debían representar significativamente a la población mexicana para el establecimiento de un rango de dicha repetición (CAG)_n.

MARCADORES GENETICOS DE POBLACIONES

El método de cuenta génica fue usado para determinar la frecuencia de los genes de cada sistema sanguíneo y haptoglobinas usados como marcadores genéticos de poblaciones. Una vez obtenidas las frecuencias de cada uno de los genes o grupos de genes de cada sistema, se realizó la prueba de X^2 para comprobar que los datos estuvieran en equilibrio con la Ley de Hardy-Weinberg y para obtener las diferencias con los datos previamente reportados, para estos mismos marcadores en nuestra población (tablas 1 a 16).

Se realizó una pequeña encuesta a 137 donadores para obtener información referente a su edad, sexo, estado de origen (tanto del donador como de sus padres) y la no existencia de antecedentes de la enfermedad.

El 100% de los voluntarios contestó que no existían antecedentes de Enfermedad de Huntington en su familia.

Un donador extranjero fue excluido del estudio.

La edad de los donadores varió de los 17 a los 49 años, siendo el promedio de 33.46 años (desviación estándar = 9.43) y con una mediana = 25 años.

Estos donadores pertenecen a 15 estados de la República Mexicana y sus padres a 20.

CUENTA GENICA PARA LA DETERMINACION DE LOS GENES ABO

		Frecuencias Provisionales
Frecuencia del gen O = r	$r_p = (O)$	$r = 0.824$
Frecuencia del gen A = p	$p_p = (O+A) - 0.824$	$p = 0.131$
Frecuencia del gen B = q	$q_p = (O+B) - 0.824$	$q = 0.043$
		$D = 0.998$

Frecuencias Corregidas

$r = r_p / D$	$r = 0.826$
$p = p_p / D$	$p = 0.131$
$q = q_p / D$	$q = 0.043$

Tabla No. 1. Prueba X^2 para el Cálculo de las Frecuencias de los Genes ABO

Fenotipo (no.)	Frecuencia Fenotípica	Frecuencia Esperada	No.	d^2	X^2	P
O	93	r^2	93.41	0.168	0.0018	>0.975
A	32	$p^2 + 2pr$	32.04	0.160	0.0050	
B	10	$q^2 + 2qr$	10.00	0	0	
AB	2	$2pq$	1.55	0.202	0.1310	
				$\Sigma =$	0.1378	

Tabla No. 2. Comparación de los Resultados Obtenidos con los Reportados Para la Población Mexicana

	Datos obtenidos	Datos esperados	d^2	X^2	P
O	0.8257	0.820	3.24×10^{-5}	3.487×10^{-7}	>0.995
A	0.1312	0.137	3.36×10^{-5}	1.049×10^{-6}	
B	0.0431	0.043	1.00×10^{-8}	1.000×10^{-8}	
				1.399×10^{-6}	
				$\Sigma =$	2.806×10^{-6}

CUENTA GENICA PARA DETERMINAR LA FRECUENCIA DE LOS GENES
MN

Tabla No. 3. Frecuencia Génica de los Genes MN

Fenotipo	No.	Genotipo	Genes M	Genes N	Frecuencia	
					M	N
M	71	MM	142	0	0.719	0.281
MN	55	MN	55	55		
N	11	NN	0	22		

Frecuencia M = p^2
 Frecuencia N = q^2
 Frecuencia MN = $2pq$

Tabla No. 4. Prueba X^2

Fenotipo	No.	Frecuencia Fenotípica	Frecuencia Esperada	No.	d^2	X^2	P
M	71	0.518	0.517	70.82	0.0324	0.00045	>0.99
MN	55	0.401	0.401	55.36	0.1296	0.00234	
N	11	0.080	0.079	10.82	0.0324	0.00299	
$\Sigma =$						0.00578	

Tabla No. 5. Comparación de los Resultados Obtenidos con los Reportados Para la Población Mexicana

	Datos Observados	Datos esperados	d^2	X^2	P
M	0.719	0.724	2.5×10^{-5}	3.5×10^{-5}	>0.900
N	0.281	0.276	2.5×10^{-5}	9.0×10^{-5}	
			$\Sigma =$	1.2×10^{-4}	

**CUENTA GENICA PARA DETERMINAR LA FRECUENCIA DE LOS GENES
Rh-Hr**

Se sabe que para este sistema el cromosoma Cde es muy raro en todas las poblaciones conocidas, especialmente cuando se presenta con CDE, por lo que para el cálculo de cuenta génica de estos resultados asumimos que las frecuencias de Cde, cdE y cde valen 0.

Tabla No. 6 Frecuencia Fenotípica de los Genes C, D y E

Fenotipos	No.	Frecuencia Fenotípica
CCDEE	0	0
CCDEe	4	0.029
CCDee	42	0.306
CcDEE	3	0.022
CcDEe	25	0.182
CcDee	30	0.218
ccDEE	14	0.102
ccDEe	8	0.058
ccDee	4	0.029
ccdee	7	0.051

Frecuencia CC = 0.029 + 0.306 = 0.335 ; Frecuencia Cc = 0.022 + 0.182 = 0.422
 $C = (2CC + Cc) / 2 = 0.546$

Frecuencia EE = 0.022 + 0.102 = 0.124; Frecuencia Ee = 0.029 + 0.182 = 0.269
 $E = (2EE + Ee) / 2 = 0.258$

Frecuencia ccee = 0.029 + 0.051 = 0.080

$CDe = \sqrt{(CCDee)} = 0.553$; $CDE = CCDEe / 2 CDe = 0.026$
 (valor preliminar) (valor final)

sustituyendo CDE, C y E en la siguiente ecuación

$$cDe + cde - (CDE + CdE) = 1 - (C + E) \text{ se tiene } cDe + cde = 0.222$$

$$\text{y también se tiene que } cDe + cde = ce = \sqrt{(ccee)} = 0.283$$

$$\text{y que } cde = \sqrt{(ccdde)} = 0.225 \text{ por lo tanto } cDe = 0.283 - cde = 0.058$$

Para referir los valores de cDe y cde a los calculados en la ecuación de sustitución por CDE, C y E

$$\begin{array}{ccc} \text{para } cde = 0.225 \longrightarrow 0.283 & \text{y} & \text{para } cDe = 0.058 \longrightarrow 0.283 \\ x \longleftarrow 0.222 & & x \longleftarrow 0.222 \\ x = 0.176 = cde & & x = 0.045 = cDe \end{array}$$

Para calcular CDe sustituimos en la siguiente ecuación y despejamos: $CDe + Cde + CDE + CdE = C$; $CDe = 0.520$

Y lo mismo para cDE: $cDE + cdE + CDE + CdE = E$; $cDE = 0.232$

Tabla No. 7. Frecuencias Génicas de los Genes C, D y E

CDE	0.026	R_2
CDe	0.520	R_1
cDE	0.232	R_2
cDe	0.045	R_0
cde	0.176	r

Tabla No. 8. Prueba de χ^2

Fenotipos		Frecuencias Esperadas
CCDEE	$(Rz)^2$	0.0007
ccdee	r^2	0.0310
ccDee	$(R_0)^2$	0.0020
CCDee	$(R_1)^2$	0.2704
ccDEE	$(R_2)^2$	0.0538
CcDEe	$2Rzr$	0.0091
CcDEe	$2RzR_0$	0.0023
CCDEe	$2RzR_1$	0.0270
CcDEE	$2RzR_2$	0.0120
ccDee	$2rR_0$	0.0158
CcDee	$2rR_1$	0.1830
ccDEe	$2rR_2$	0.0817
CcDee	R_0R_1	0.0468
ccDEe	R_0R_2	0.0209
CcDEe	R_1R_2	0.2413

Tabla No. 9. Agrupación de Fenotipos Iguales

Fenotipo	Frec. Esperada	No. Esperado	No. Observado	d^2	χ^2	P	
CCDEE	0.0007	0.09	0	0.0081	0.090	>0.100	
CCDEe	0.0270	3.70	4	0.09	0.024		
CCDee	0.2704	37.0	42	24.50	0.661		
CcDEE	0.0121	1.64	3	1.84	1.127		
CcDEe	0.2527	34.6	25	91.97	2.650		
CcDee	0.2298	31.5	30	2.190	0.069		
ccDEE	0.0538	7.37	14	43.95	5.963		
ccDEe	0.1026	14.1	8	36.72	2.610		
ccDee	0.0179	2.44	4	2.43	0.995		
ccdee	0.0310	4.25	7	7.56	1.778		
				$\Sigma =$	15.967		

Tabla No. 10. Comparación de los Resultados Obtenidos con los Reportados
Para la Población Mexicana

Genotipo	Frec. Esperada	Frec. Observada	d ²	X ²	P
CDE	0.047	0.026	0.0004	0.0094	>0.100
CDe	0.505	0.520	0.0002	0.0004	
cDE	0.283	0.232	0.0026	0.0092	
cDe	0.020	0.045	0.0006	0.0312	
cde	0.145	0.176	0.0751	0.5177	
			$\Sigma =$	0.5680	

CUENTA GENICA PARA DETERMINAR LA FRECUENCIA DE LOS GENES
Fy^a Y Fy^b

Fenotipos	Genotipo	Frecuencia
Fy ^a +	Fy ^a + Fy ^b	p ² + 2pq
Fy ^a -	Fy ^b	q ²

Tabla No. 11. Frecuencias Génicas de los Genes Fy

Fenotipo	No.	Frecuencia Fenotípica	Frecuencia Fy ^a	Frecuencia Fy ^b
Fy ^a +	115	0.839	0.598	0.4012
Fy ^a -	22	0.161		

Tabla No. 12 Prueba de X²

	No. Observado	Frec. Obs.	Frec. Esperada	No. Esperado	d ²	X ²	P
Fy ^a +	115	0.839	0.837	114.7	0.09	7.84 x 10 ⁻⁴	>0.900
Fy ^a -	22	0.161	0.161	22.3	0.09	4.03 x 10 ⁻³	
						Σ = 4.81 x 10 ⁻³	

Tabla No. 13. Comparación de los Resultados Obtenidos con los Reportados Para la Población Mexicana

	Datos Obtenidos	Datos Esperados	d ²	X ²	P
Fy ^a	0.598	0.333	0.0702	0.210	>0.500
Fy ^b	0.401	0.667	0.0706	0.106	
				Σ = 0.316	

**CUENTA GENICA PARA DETERMINAR LA FRECUENCIA DE
HAPTOGLOBINAS**

Tabla No. 14. Frecuencia Génica de los Genes de Haptoglobinas

Fenotipo	No.	Genotipo	Genes Hp1	Genes Hp2	Frecuencia Hp1.1	Frecuencia Hp2.1
Hp 1.1	12	1.1	24	0	0.288	0.712
Hp 2.1	44	2.1	44	44		
Hp 2.2	62	2.1	0	124		

Frecuencia Hp 1.1 = p^2

Frecuencia Hp 2.2 = q^2

Frecuencia Hp 2.1 = $2pq$

Tabla No. 15. Prueba X^2

Fenotipo	No.	Frec. Fenotípica	Frec. Esperada	No.	d^2	X^2	P
Hp 1.1	12	0.107	0.083	9.30	7.29	0.783	>0.500
Hp 2.1	44	0.372	0.410	48.5	20.2	0.417	
Hp 2.2	62	0.525	0.507	59.9	4.41	0.073	
					$\Sigma =$	1.273	

Tabla No. 16. Comparación de los Resultados Obtenidos con los Reportados
Para la Población Mexicana

	Datos Observados	Datos Esperados	d^2	X^2	P
Hp 1	0.2881	0.578	0.084	0.145	>0.500
Hp 2	0.7119	0.422	0.084	0.145	
			$\Sigma =$	0.344	

Tabla No. 17 Resumen:
Fenotipos y Frecuencias Génicas de los Diferentes Marcadores Genéticos Utilizados para la Caracterización de la Población Mexicana

Sistema	Fenotipo	No.	Gen	Frecuencia	X ²	P >
ABO	O	93	O	0.8257	0.1378	0.975
	A	32	A	0.1312		
	B	10	B	0.0431		
	AB	2				
MN	M	71	M	0.719	0.01156	0.990
	MN	55	N	0.281		
	N	11				
Rh - Hr	CCDEE	0	CDE	0.047	15.967	0.100
	CCDEe	4	CDe	0.505		
	CCDee	42	cDE	0.283		
	CcDEE	3	cDe	0.020		
	CcDEe	25	cde	0.145		
	CcDee	30				
	ccDEE	14				
	ccDEe	8				
	ccDee	4				
	ccdee	7				
Duffy	Fy ^a +	115	Fy ^a	0.5980	4.81 x 10 ⁻³	0.900
	Fy ^a -	22	Fy ^b	0.4012		
Haptoglobinas	Hp 1.1	12	Hp 1	0.2881	1.273	0.500
	Hp 2.1	44	Hp 2	0.7119		
	Hp 2.2	62				

Debido a que no pudieron obtenerse los sueros de 19 personas para el estudio de las haptoglobinas, el número de esta muestra fue menor.

La tabla 17 indica que los marcadores están en equilibrio con la Ley de Hardy-Weinberg y que no existen diferencias significativas entre los datos obtenidos y los reportados por otros investigadores (tablas 1 a 16), por lo que nuestra muestra es altamente representativa de la población mestiza mexicana.

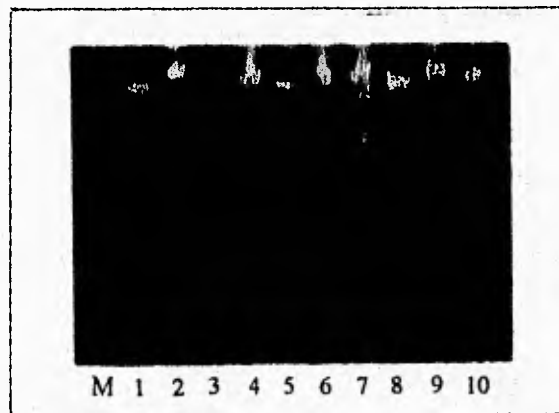
De los 137 controles analizados, fueron seleccionadas 50 muestras femeninas y 50 masculinas para el estudio de su DNA.

EXTRACCION DE DNA

Se obtuvo el DNA de 22 muestras a partir de 20 ml de sangre periférica por la técnica de lisis de glóbulos rojos y proteinasa K con extracciones sucesivas de fenol-cloroformo tal y como se describió en la parte de material y métodos. Las restantes 78 muestras fueron extraídas por micrométodo.

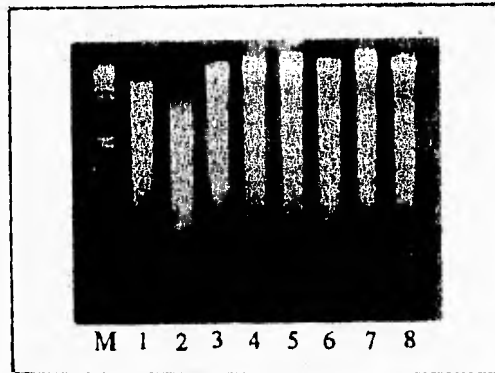
Todos los extractos de DNA se analizaron en electroforesis en gel de agarosa. Se observó que independientemente del método de extracción en un 86.25% de las muestras se presentan bandas de barrido por degradación del DNA (fotografía 1 y 2A), sin embargo 99 muestras tuvieron bandas de DNA de alto peso molecular. Se estimó por apreciación de la intensidad de las bandas con respecto a la concentración conocida del marcador de peso molecular que la mayoría de las muestras de DNA contenían una concentración mínima de 471.1 ng/μl, por lo que de igual forma fueron usados para el PCR.

Para limpiar algunos DNA's se realizó una segunda extracción para eliminar las DNAsas que pudieran haber quedado. Dos muestras fueron tratadas con GeneClean, y como se ve en la fotografía 2B, el barrido de degradación desaparece por completo y se obtiene el DNA limpio de gran peso molecular, pero el rendimiento es muy bajo ya que solamente logra recuperarse un poco del DNA inicial. Este método se recomienda por lo tanto, para muestras que inicialmente no amplifiquen la zona repetida y que contengan una alta concentración de DNA.

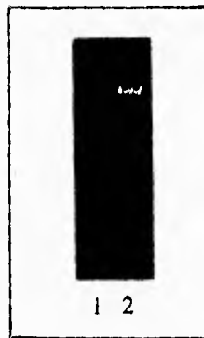


Fotografía 1. Electroforesis de DNA en Gel de Agarosa. Obtenidos por extracción con Fenol-Cloroformo y Proteínasa K: carriles 6, 7, 8, 9 y 10. Los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 son las bandas de DNA extraído mediante micrométodo. El carril marcado como M es el marcador de peso molecular Lambda DNA-Hind III cuyos fragmentos miden 23130 pb, 239.05 ng/ μ l; 9416 pb, 97.31 ng/ μ l; 6557 pb, 67.76 ng/ μ l; 4361 pb, 45.07 ng/ μ l; 2322 pb, 23.99 ng/ μ l; 2027 pb, 20.95 ng/ μ l y 564 pb, 5.82 ng/ μ l.

A



B



Fotografía 2. Electroforesis de DNA en Gel de Agarosa. En la parte A se observan las bandas correspondientes a los DNA control que fueron extraídos mediante micrométodo. Los carriles 1 y 2 no presentan DNA íntegro sino solamente los barridos de degradación, todas las muestras amplificaron la región repetida del gen IT15. M es el marcador de peso molecular Lambda DNA-Hind III.

En B se presentan dos muestras de DNA después de haber sido purificadas con GeneClean. Se observa como las bandas de degradación desaparecen.

AMPLIFICACION POR PCR

Para la amplificación de la secuencia repetida CAG, inicialmente fueron modificadas algunas condiciones de las reportadas (24). Las reacciones se llevaron a cabo en un total de 25 μ l de mezcla de reacción utilizando 1 μ g de cada iniciador, 5% de DMSO, 1 μ Curie de radiación, y no se usó Perfectmatch. Bajo estas nuevas condiciones se realizaron los primeros ensayos, y los productos amplificados se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% de 16 x 19 cm y sin marcador de peso molecular, únicamente para comprobar que la reacción se hubiera llevado a cabo. Debido al tamaño del gel no es posible distinguir las bandas que componen cada alelo con toda claridad, pero sí se notan las dos intensas marcas que presentan los cromosomas de individuos heterocigotos (fotografía 3).

Una vez que se confirmó que si estábamos amplificando la zona repetida del gen IT15, los productos fueron analizados en geles de secuenciación de 35 x 43 cm; en éstos la resolución aumenta considerablemente por lo que los alelos se observan como una serie de pequeñas bandas, de las que en la mayor parte de los casos la más intensa fue la de mayor peso molecular.

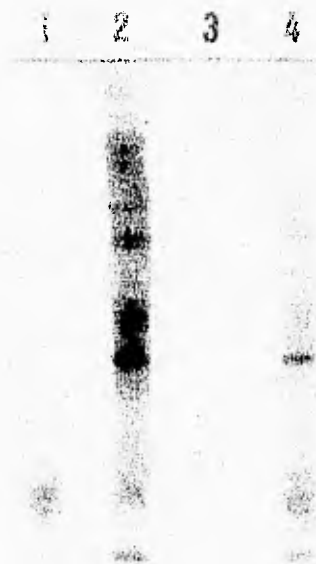
Se intentó aumentar la amplificación del producto específico modificando las condiciones. Primero se aumentó la concentración del DMSO al 10%, pero aunque disminuyen los productos inespecíficos, la reacción se ve inhibida porque la actividad de la DNA polimerasa es menor a mayor concentración de DMSO. Se aumentó la concentración de los iniciadores a 2.5 μ g por reacción, y aunque las bandas específicas son más definidas, la intensidad es mínima. Al exponer más tiempo para aumentar la intensidad de las marcas, se aumenta también la señal de los productos inespecíficos.

Con otro experimento se comprobó que al aumentar la actividad de la Taq DNA polimerasa a 2.5 U/ μ l para evitar la inhibición por el aumento de DMSO, se obtienen solamente bandas inespecíficas. En la fotografía 4 se corrieron simultáneamente las reacciones para un control que sabíamos que era heterocigoto: en el carril 1 se ve el amplificado con 1.25 U de Taq DNA polimerasa y 5% de DMSO, los carriles 2 y 4 contienen 2.5 U de polimerasa y 5 y 10% de DMSO respectivamente. Se observa como la actividad tan alta de la enzima produce sólo bandas inespecíficas, y cómo se ve afectada por el aumento de DMSO ya que en el carril 2 se presentan bandas más intensas que en el 4; finalmente, el carril 3 es el producto amplificado del mismo control con 1.25 U de

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Fotografía 3. Autorradiografía de los Productos Amplificados por PCR. Debido al tamaño del gel (16 x 19 cm) no pueden verse las diferentes bandas que comprenden cada alelo, pero si se observa que los carriles 2, 4, 7, 8, 12, 16 y 18 presentan dos claras marcas que corresponden al estado heterocigoto. La muestra del carril 16 indicada con la flecha presentó un alelo muy grande, y al analizarla en gel de secuenciación (35 x 45 cm) se detreminó un expandido de 42 repetidos, que pertenece al rango mutado.



Fotografía 4. Autorradiografía de los Productos de PCR. En este experimento se variaron las condiciones de DMSO y Taq DNA polimerasa para intentar definir más las bandas obtenidas de los amplificados. Los 4 carriles son los productos de una muestra control heterocigota; en el carril 1: DMSO al 5% y 1.25 U de Taq DNA polimerasa, carril 2: 2.5 U de Taq DNA polimerasa y 5% de DMSO, carril 3: 1.25 U de Taq DNA polimerasa y DMSO al 10%, carril 4: 2.5 U de Taq DNA polimerasa y 10% de DMSO.

polimerasa y 10% de DMSO y en este caso la reacción se ve muy disminuida comparando con el carril 1.

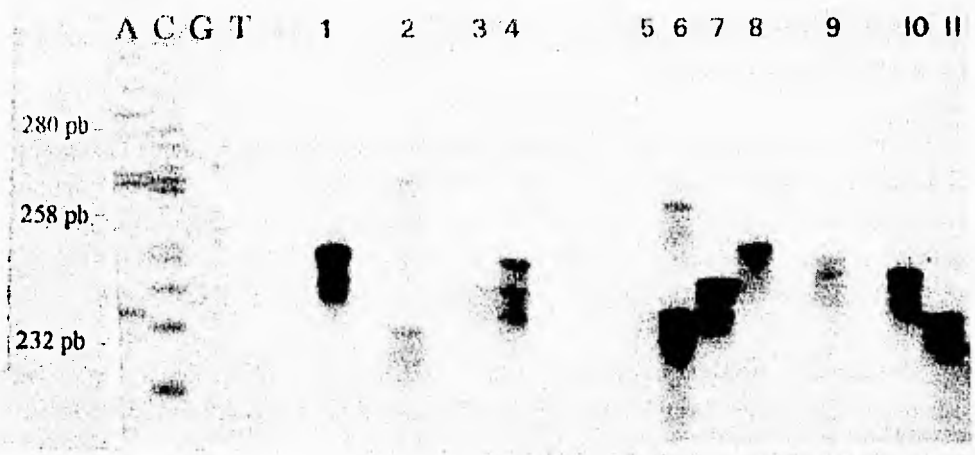
Debido a que con estas condiciones no se logró obtener una mayor definición de los productos de PCR, se decidió volver a las condiciones iniciales. Únicamente se disminuyó el voltaje a 950 V en la electroforesis, y se dejó que corriera durante 6 horas para que las bandas pudieran separarse lo más posible.

Una vez realizadas las electroforesis de los amplificadores, se obtuvieron, al analizar las placas de autorradiografía, bandas entre 231 y 290 pares de bases. Estos productos se observan como una serie de bandas muy cercanas entre sí para cada alelo; de estas bandas en el 98% de los casos la más intensa fue la de mayor peso molecular (fotografías 5, 6, 7 y 8) y ésta se tomó como referencia para calcular el tamaño del alelo referido a la secuencia del marcador de peso molecular.

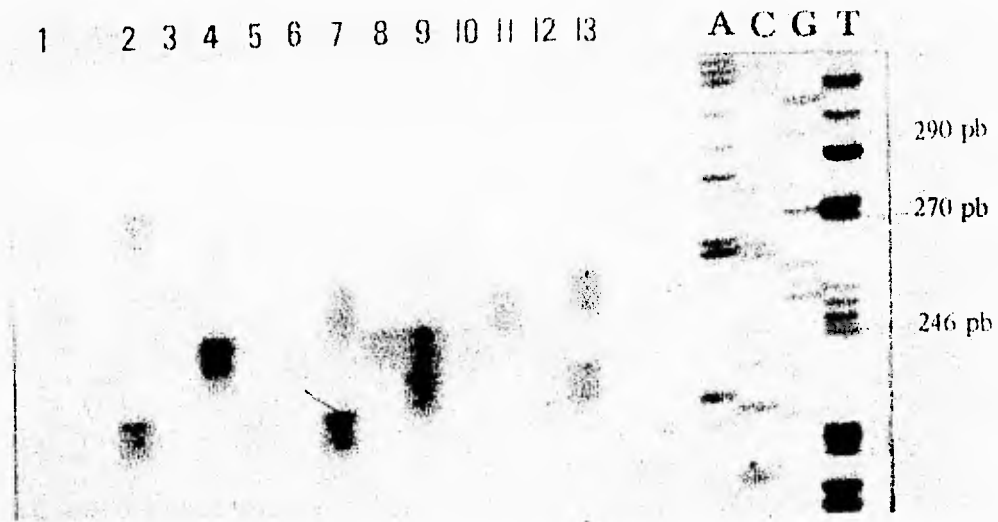
Una de las muestras control presentó una banda de 319 pares de bases (fotografía 3), lo que corresponde a 42 tripletes CAG repetidos. Debido a este valor tan alto, la muestra fue excluida para el análisis de controles normales. Para no desajustar los 100 controles, se incluyó una nueva muestra en lugar de la expandida. Otros 4 DNA's que no amplificaron la zona repetida después de varios intentos, fueron también sustituidos.

De los 100 controles que finalmente fueron estudiados, 67 presentaron dos juegos de bandas perfectamente definidas que indican el estado heterocigoto. Las restantes 33 son muestras de individuos homocigotos para la repetición CAG.

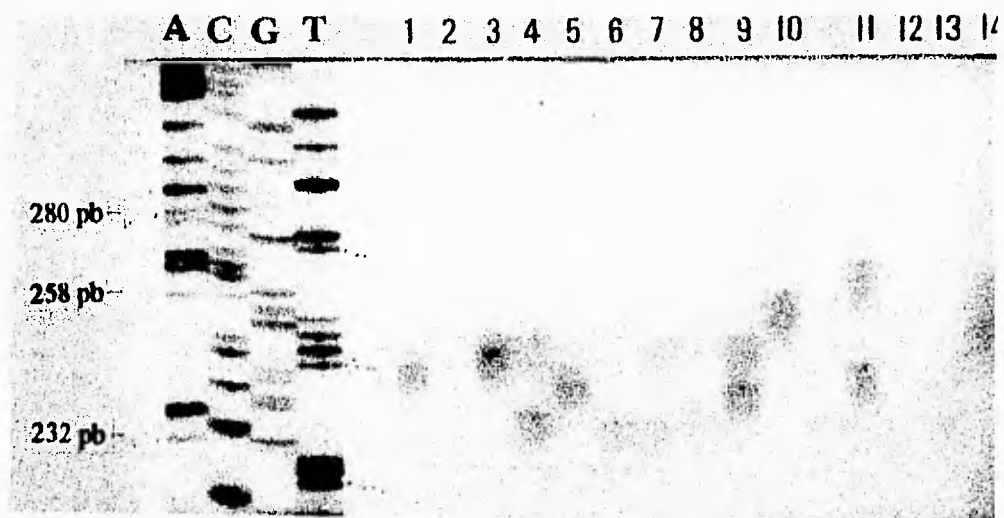
En total fueron contados 167 diferentes cromosomas de los donadores normales, y tomando en cuenta los alelos normales de los miembros de la familia estudiada, se obtuvieron los datos de 8 cromosomas más, lo que dio un total de 175 genes normales analizados, de los cuales se obtuvieron 18 alelos distintos, cuyas frecuencias son:



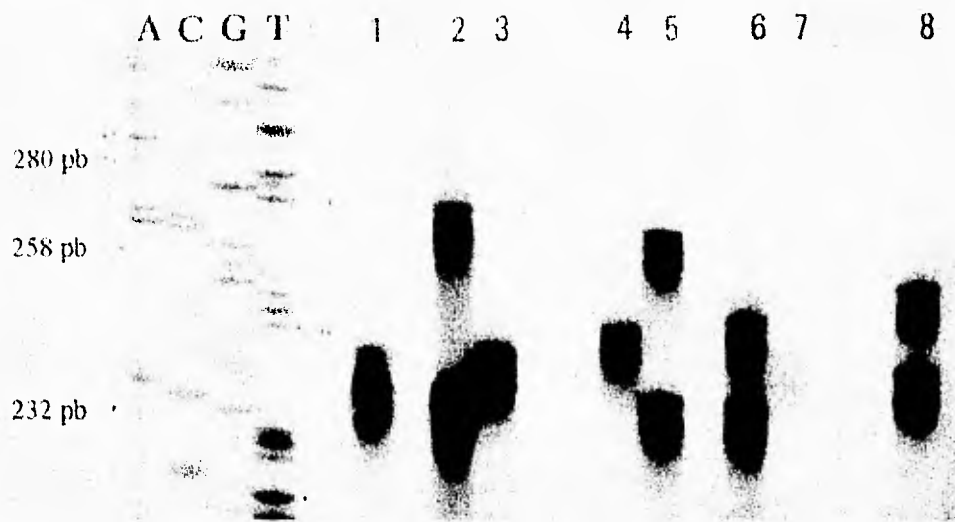
Fotografía 5. Autorradiografía de los Productos de PCR: Muestras Control. Electroforesis en geles (35 x 45 cm) desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%: carriles A C G T secuencia del marcador de peso molecular. Los tamaños determinados para estos controles fueron: carril 1, 17 TR (tripletes repetidos); 2, 25/13 TR; 3, 15 TR; 4, 17/15 TR; 5, 14 TR; 6, 22/14 TR; 7, 16 TR; 8, 18 TR; 9, 18/17 TR; 10, 17 TR y 11, 15 TR.



Fotografía 6. Autorradiografía de los Productos de PCR: Muestras Control. Los tamaños de cada alelo para las muestras analizadas son: carril 1, 28/21 TR; 2, 28/14 TR; 3, 22/19 TR; 4, 25/19 TR; 5, 20/14 TR; 6, 17 TR; 7, 22/14 TR; 8, 19 TR; 9 19/16 TR; 10, 23/19 TR; 11, 20 TR; 12, 19/15; 13, 23/17. Los tamaños fueron obtenidos como en la fotografía 5 (carriles A C G T)



Fotografía 7. Autorradiografía de los Productos de PCR: Muestras Control. Los tamaños que se obtuvieron en este ensayo fueron: carril 1, 18 TR; 2, 20 TR; 3, 18 TR; 4, 20/14 TR; 5, 16 TR; 6, 19/14 TR; 7, 20/16 TR; 8, 19/16 TR; 9, 24/17 TR; 10, 16 TR; 11, 14 TR; 12, 18/13 TR; 13, 22 TR; 14, 13 TR. Los carriles A C G T son el marcador de peso molecular.



Fotografía 8. Autorradiografía de los Productos de PCR: Muestras Control. En esta placa se observan los amplificados de más controles normales. El tamaño de los alelos de las muestras analizadas fue: carril 1, 14/16 TR; 2, 26/13 TR; 3, 16 TR; 4, 18 TR; 5, 24/14 TR; 6, 19/14 TR; 7, 15 TR; 8, 21/16 TR. Los carriles A C G T son la secuencia del marcador de peso molecular.

Tabla No. 18. Diferentes alelos del Repetido CAG del gen IT15 de la Población Normal Mexicana.

No. Tripletes CAG	No. Casos	Frecuencia %
13	6	3.42
14	21	12.0
15	12	6.85
16	22	12.57
17	21	12.0
18	17	9.71
19	28	16.0
20	10	5.71
21	8	4.57
22	14	8.0
23	2	1.14
24	5	2.85
25	2	1.14
26	1	0.57
27	1	0.57
28	2	1.14
29	2	1.14
32	1	0.57
	175 alelos	100%

El rango normal para nuestra población se estableció en 13 CAG repetidos para el alelo menor y 32 repetidos para el mayor (tabla 18).

El 87.4% de la población tiene genes entre 22 y 14 repetidos. Casi el total (90.8%) tiene repetidos de 13 a 22 copias CAG. Los alelos de mayor tamaño, es decir de 23 a 32 repetidos suman entre todos un 9.14%.

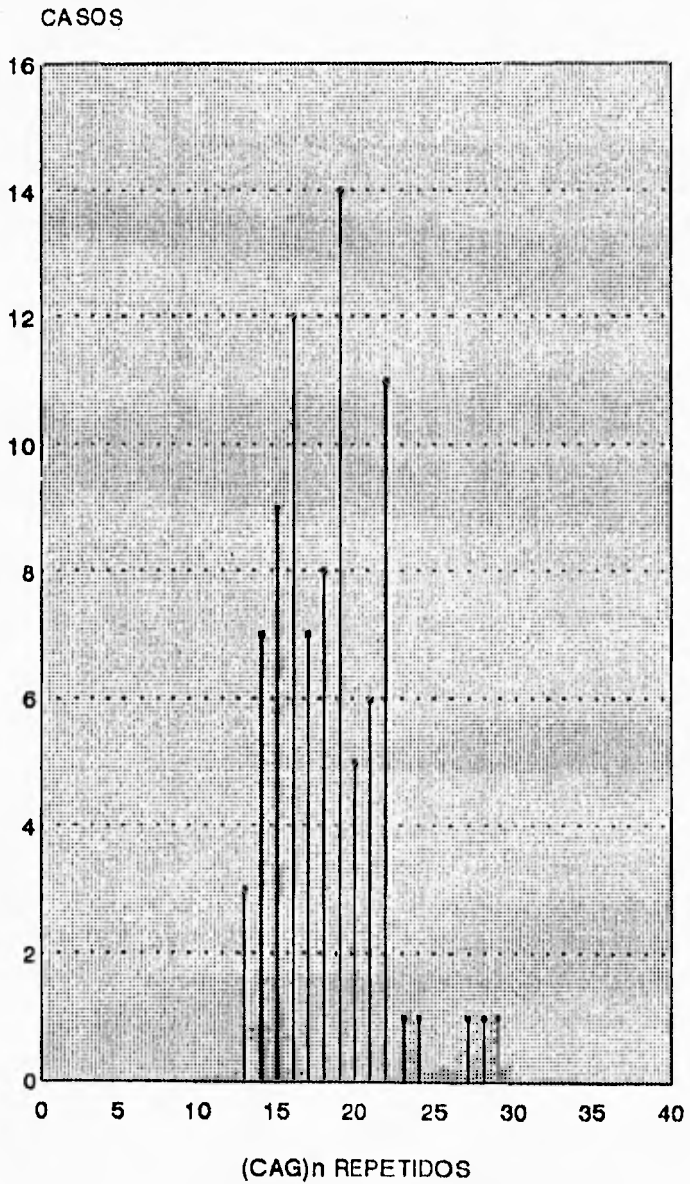
Estudiando únicamente la población normal obtuvimos los siguientes resultados dividiendo por sexos:

Tabla No. 19. Alelos del Sexo Femenino

No. Tripletes CAG	No. de Casos	Frecuencia %
13	3	3.4
14	7	7.95
15	9	10.22
16	12	13.63
17	7	7.95
18	8	9.09
19	14	15.9
20	5	5.68
21	6	6.82
22	11	12.5
23	1	1.14
24	1	1.14
27	1	1.14
28	1	1.14
29	1	1.14

En total fueron contados 88 cromosomas femeninos, de los cuales 74 pertenecen a 37 muestras heterocigotas. Se obtuvo un 74% de heterocigocidad y un 26% de homocigotos, es decir 13 muestras. La distribución de los diferentes alelos femeninos se ve en la gráfica 1. Los alelos más frecuentes en este caso son los de 19, 16 y 22 repetidos, y los menos frecuentes son los de 23 copias y mayores.

POLIMORFISMO DE LA SECUENCIA REPETIDA
SEXO FEMENINO



↑ ALELOS NORMALES

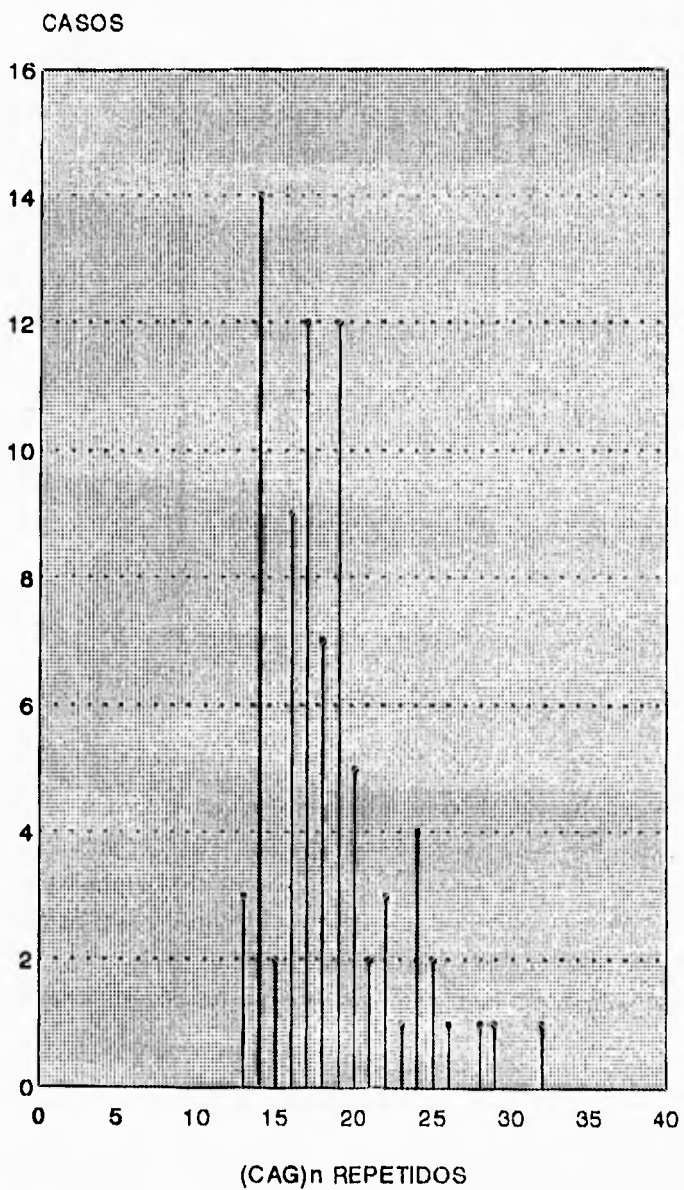
Gráfica No.1

Tabla No. 20. Alelos del Sexo Masculino

No. Tripletes CAG	No. Casos	Frecuencia %
13	3	3.75
14	14	17.5
15	2	2.5
16	9	11.25
17	12	15.0
18	7	8.75
19	12	15.0
20	5	6.25
21	2	2.5
22	3	3.75
23	1	1.25
24	4	5.0
25	2	2.5
26	1	1.25
28	1	1.25
29	1	1.25
32	1	1.25

Al estudiar los controles masculinos se obtuvieron los siguientes porcentajes: 40% fueron homocigotos, y 60% fueron heterocigotos. Esto correspondió a 20 y 30 muestras respectivamente, dando un total de 80 cromosomas diferentes estudiados. La gráfica 2 también muestra la distribución del polimorfismo CAG del gen IT15 para la población masculina de nuestro país. En este caso los alelos más frecuentes son los de 14, 19 y 17 repetidos CAG, aunque en menor proporción también se encontró una frecuencia elevada (5%) de alelos de 24 repetidos.

POLIMORFISMO DE LA SECUENCIA REPETIDA
SEXO MASCULINO



Gráfica No.2

GENES AFECTADOS

Se realizó el estudio de una familia mexicana con antecedentes de la enfermedad, la figura 9 muestra su árbol genealógico. En él se puede observar las personas afectadas marcadas con las figuras en color, las figuras cruzadas son los miembros que han muerto, la figura sombreada es una persona en riesgo (no presenta síntomas). Se estudiaron las muestras 1 a la 6. Las muestras 2, 3 y 4 son pacientes con la forma adulta típica del padecimiento y la muestra 6 es una forma de Enfermedad de Huntington Infantil heredada por vía paterna.

ARBOL GENEALOGICO

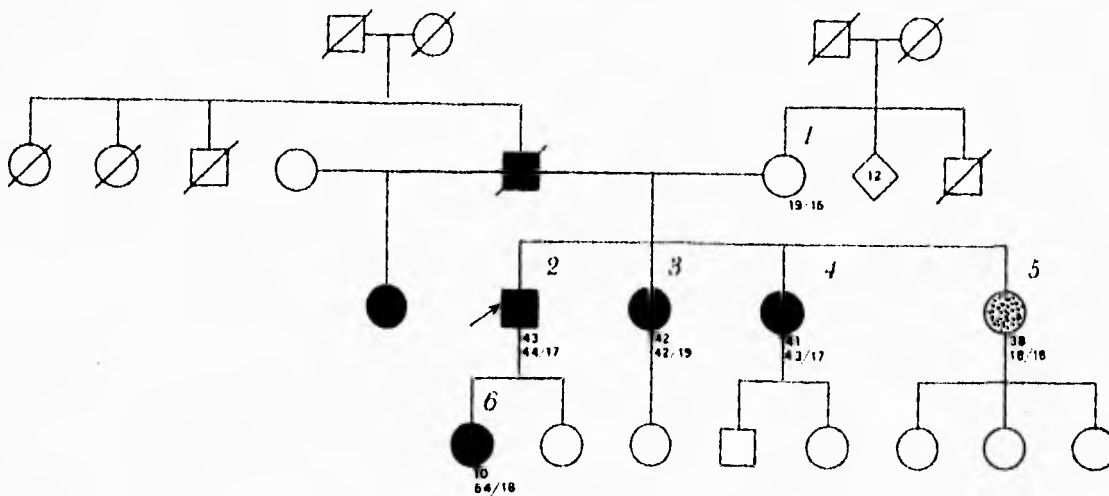


Figura 9. Arbol Genealógico de la familia afectada estudiada. Las figuras coloreadas corresponden a los miembros afectados de esta familia, con lo que puede observarse la clara herencia autosómica dominante. Las 6 muestras analizadas están indicadas con números grandes del 1 al 6 arriba de cada figura. Los números pequeños indican la edad de inicio de los síntomas y los que están abajo por parejas son los alelos detectados. La flecha marca el caso índice (el que primero acudió a consulta) de toda la familia

Del estudio de esta familia mexicana con antecedentes de Enfermedad de Huntington se obtuvieron los siguientes resultados:

Se analizó el DNA de 6 individuos, de los cuales 4 presentan síntomas, uno es control normal y otro era un individuo en riesgo.

El análisis de los 4 pacientes muestra que todos presentan un alelo normal y otro expandido:

Tabla No. 21. Personas Afectadas con Enfermedad de Huntington de la Familia Analizada

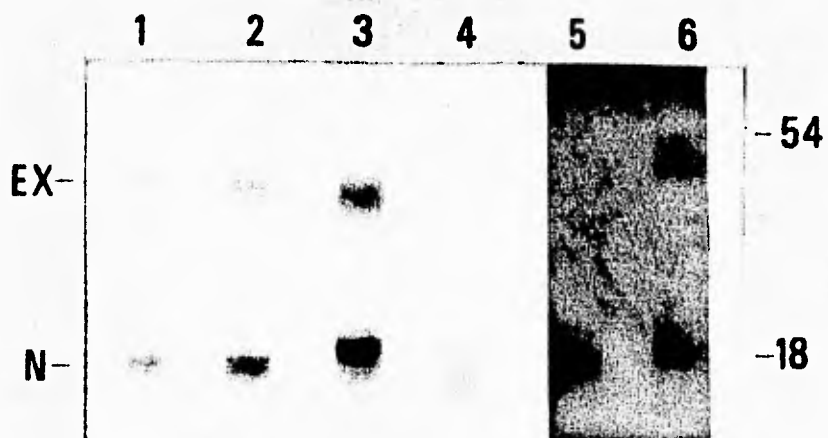
Muestra No.	Alelo Normal	Alelo Expandido	Edad de Inicio (Años)
2	17	44	43
3	19	42	42
4	17	43	41
6	18	54	10

La muestra 1, por ser la esposa del abuelo afectado se tomó como control normal, y el análisis de su DNA mostró, tal como se esperaba, dos alelos de tamaño normal de 19 y 15 repetidos CAG, respectivamente.

La muestra 5, que pertenece a una persona en riesgo, es decir que actualmente no presenta sintomatología de la enfermedad pero tiene posibilidad de hacerlo por pertenecer a una familia con antecedentes, presentó en sus cromosomas alelos normales de 18 y 16 repetidos, que fueron difíciles de distinguir, debido a que la diferencia entre ellos es mínima (solo 6 pb). Por no haber heredado la expansión, esta persona no desarrollará la enfermedad.

Todas las muestras fueron analizadas por segunda vez para descartar posibles equivocaciones y confirmar los resultados (fotografía 9).

Se graficaron los datos obtenidos de todos los cromosomas estudiados (tanto los normales como los afectados), y como puede verse (gráfica 3) no existe traslape entre los alelos normales y los expandidos. Aunque la población afectada que se analizó en este estudio es muy pequeña, es posible determinar un patrón bien definido de casos normales

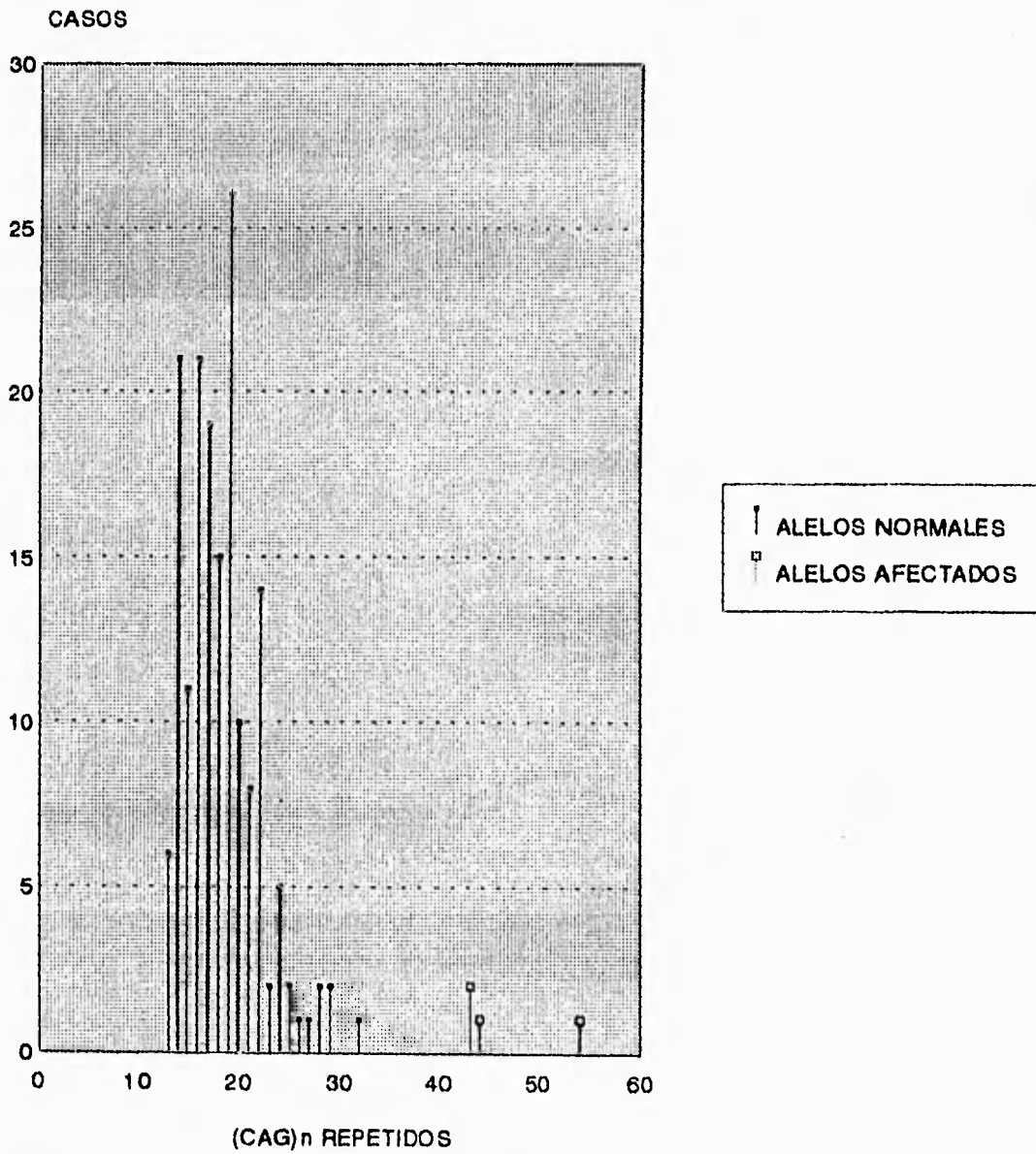


Fotografía 9. Autorradiografía de los Productos de PCR: Familia Mexicana con Antecedentes de Enfermedad de Huntington. De las 6 muestras que fueron analizadas los carriles 1, 2, 3 y 6 presentan un alelo normal y otro expandido y sus respectivos tamaños son 17/44 TR; 19/42 TR; 43/17 TR y 54/18 TR.

Los carriles 4 y 5 presentaron cromosomas normales de 19/15 el primero y 18/16 tripletes repetidos el segundo.

POLIMORFISMO CAG DEL GEN IT15

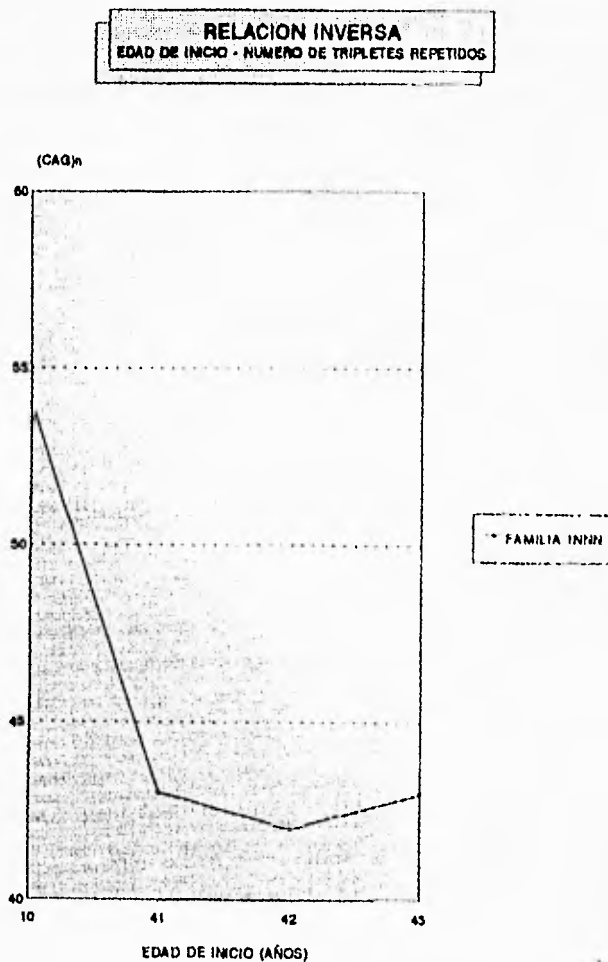
POBLACION MEXICANA



Gáfica No.3

y afectados. La zona de 33 a 41 repetidos no son alelos normales, y por haber estudiado una muestra tan pequeña de casos afectados no fue posible establecer el menor valor expandido causante de la enfermedad, sin embargo consideramos que el rango premutado se encuentra entre las 33 y 35 copias CAG del gen, porque mayores expandidos (de 36 unidades en adelante) se ha visto que provocan la enfermedad en otras poblaciones.

Se obtuvo una correlación inversa entre el tamaño de la expansión y la edad de inicio del padecimiento; y aunque en este trabajo no se contó más que con 4 muestras afectadas, es posible ver una clara relación del aumento del número de copias CAG y la disminución de la edad de los síntomas (gráfica 4).



Gráfica No 4

6. DISCUSION

La muestra escogida como representativa de la población mexicana normal para el estudio del gen IT15, causante de la Enfermedad de Huntington es adecuada ya que los marcadores genéticos clásicos de poblaciones obtenidos, son iguales a los reportados en investigaciones previas. Para el caso de la determinación de haploglobinas nuestros resultados varían de los reportados ya que nuestros valores están en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, mientras que los reportados en la referencia 32 no lo están. No sabemos si estos resultados son consecuencia de una mala interpretación de los diferentes genotipos, debido a que la manipulación de los geles de almidón es difícil y provoca confusión en los patrones de bandeos observados. Sin embargo, los restantes 10 marcadores estudiados son muy representativos (no existen diferencias estadísticamente significativas) de los datos obtenidos previamente.

En el estudio directo del gen IT15 en nuestra población se determinó que la región de trinucleótidos repetidos CAG es altamente polimórfica, y la distribución de los diferentes alelos encontrados es muy similar a las reportadas recientemente para otras poblaciones.

USO DEL PCR PARA LA DETERMINACION DE LA SECUENCIA CAG

La técnica de PCR es muy eficiente para amplificar la región CAG repetida del gen de la enfermedad de Huntington, ya que de 104 muestras, solamente 4 no amplificaron (3.8%) debido a que la calidad del DNA no era la adecuada o existían inhibidores de la reacción de los reactivos usados en la extracción. Esto se comprobó al ensayar varias muestras al mismo tiempo, si algún reactivo hubiera estado mal preparado, ninguna reacción habría amplificado, por lo que pudimos determinar que la causa de que no pudieran llevarse a cabo estas reacciones en algunas muestras dependía de cada una en particular, ya que aún probando varias concentraciones de éstas no se logró su amplificación, debido a la calidad de DNA que se obtuvo.

Algunas otras muestras fueron tratadas con GeneClean para eliminar los barridos de degradación que presentaron. Este tratamiento es adecuado para aquellas en las que se tiene, además de las bandas de degradación, una gran cantidad de DNA íntegro, ya que en los casos de muestras en las que casi la totalidad del DNA se presentaba como degradado, después de limpiarlo, muy poco o nada podía recuperarse. Sin embargo, otros DNA's quedaron perfectamente limpios para poder realizar el PCR sin ningún problema.

Establecimos las condiciones adecuadas para la amplificación de esta región repetida, que aunque no rinden un amplificado perfecto, sí es un producto de buena calidad y adecuado para la determinación exacta de las veces en que la secuencia CAG se repite en nuestra población.

Para determinar las condiciones finales para la amplificación, se tuvieron que realizar varios ensayos en los que inicialmente se intentó definir un poco más las bandas para cada alelo que presenta una muestra. Pensamos que aumentando la concentración de DMSO al 10% se evitaría más la formación de estructuras secundarias del DNA y de los iniciadores por lo que esperábamos de esta forma disminuir o eliminar también el fondo inespecífico de la reacción. Sin embargo este aumento afectó la actividad de la Taq DNA polimerasa y el rendimiento de la reacción bajó drásticamente.

Para evitar que la alta concentración de dimetilsulfóxido afectara la amplificación de nuestra secuencia de interés, intentamos aumentar la actividad de la polimerasa también al doble (2.5 unidades por reacción); el resultado fue la amplificación de únicamente fragmentos de DNA inespecíficos, por lo que en la radiografía observamos bandas de una gran variedad de tamaños a todo lo largo del gel. Se ha reportado este fenómeno de amplificaciones inespecíficas con un aumento en la actividad de la enzima, y pudimos comprobarlo, por lo que decidimos usar la actividad inicial de 1.25 U de Taq DNA polimerasa con una concentración de 5% de DMSO.

POLIMORFISMO DE LA SECUENCIA CAG REPETIDA

De los 100 DNA's analizados (50 muestras masculinas y 50 femeninas) se determinó una heterocigocidad del 67% y por lo tanto un 33% para los homocigotos. Los alelos más frecuentes son los de 19 repetidos, seguidos de los de 14, 16 y 17. El 86.8% lo abarcan los alelos de 14 a 22 repetidos, y casi el total de la población, 90.4%, tiene repetidos entre 13 y 22 trinucleótidos repetidos. El alelo de mayor tamaño encontrado tiene 32 copias CAG por lo que el rango normal queda en 13 repetidos para el alelo menor y de 32 para el mayor.

Se han reportado mayores porcentajes de heterocigotos para este gen en otras poblaciones y pudiera ser que en las muestras analizadas, debido a que el producto no es una banda única bien definida sino que son una serie de pequeñas bandas muy cercanas entre sí, pudieran traslaparse provocando diferencias muy sutiles que no puedan ser observadas fácilmente entre los alelos de personas heterocigotas por sólo un triplete.

Se ha reportado la existencia de bandas extra por arriba de la más intensa en las amplificaciones de los alelos expandidos en muestras de pacientes, y que corresponden a poblaciones celulares con diferente número (mayor) de repetidos CAG. Nosotros no encontramos estas bandas al realizar el estudio en linfocitos de sangre periférica, y debido a que tanto las muestras expandidas y los controles muestran bandas de menor peso molecular a la banda más intensa podemos concluir que son producto de la técnica de PCR y no tienen que ver con mosaicismo.

No se encontró una gran diferencia entre el tamaño de los alelos al comparar los datos obtenidos entre los sexos de la población normal. Aunque si se observa que los hombres presentan de manera más frecuente un alelo de 14 repetidos, que es de los más pequeños encontrados, mientras que en las mujeres el más frecuente es el de 19 repetidos seguido por el de 16 copias. Por otro lado, también se detreminó que los hombres presentan cromosomas con más altos números de repetidos CAG con alta frecuencia, es decir, existe una mayor población de genes con repetidos mayores a 23 copias para esta población masculina estudiada. Se ha sugerido que este hecho pudiera provocar inestabilidad al momento de transmitirlos a su descendencia, produciendo casos esporádicos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

También se observa que existe una mayor heterocigocidad en mujeres, que se encuentra alrededor del 74%, en contra del 60% que se determinó para el sexo masculino. Respecto a los valores mayor y menor para cada uno, el alelo de 13 tripletes fue el de menor tamaño para ambos y en un hombre se detectó un repetido de 32 copias que representa el alelo de mayor tamaño detectado en toda nuestra muestra. Para las mujeres el alelo más grande fue de 29 repetidos.

Esta diferencia no indica que exista un rango distinto para hombres que para mujeres, sino que por el contrario se puede observar que existe una distribución muy similar para los alelos que se encuentran por arriba de las 23 copias. Esto puede explicarse porque la mayor parte de la población (90.4%) tiene en sus genes repetidos entre 14 y 22 alelos, por lo que se encontrará siempre una mayor variabilidad al estudiar este rango.

Durante este estudio, a una persona de 27 años de edad, que inicialmente había sido seleccionada para ser control normal, le fue detectado un alelo expandido de 42 repetidos en uno de sus cromosomas, por lo que fue descartada como control normal para el análisis. Aparentemente no existen antecedentes de la enfermedad para esta persona pero el estudio del DNA de sus padres, podría indicar que cualquiera de ellos, pero más posiblemente su padre, presenta un alelo premutado que se expandió en la siguiente generación, y pudiera pertenecer al grupo de los hombres con genes normales altos que encontramos con este estudio, pudiendo estar asociado además a la edad avanzada éste. Es posible que si el papá de este individuo contiene un alelo intermedio no presente nunca la sintomatología de la enfermedad y permanezca toda su vida como portador sano. Pero debido a que su hijo sí tiene una clara expansión sería muy posible que desarrollara la enfermedad algún día, tal y como se ha reportado para algunos casos esporádicos. Se han dado a conocer casos de personas con alelos intermedios al hacer el estudio de la población normal de varios países (45, 66), estas personas con posibles premutaciones han sido descartadas para establecer un límite normal, y no se sabe si en algún momento desarrollarán el padecimiento; sin embargo, en nuestro caso el alelo detectado a esta supuesta persona normal, no representa una premutación sino una mutación completa, pero aún así no es posible determinar si desarrollará la enfermedad tal y como la han dicho Kremer y colaboradores (28), aunque tiene una gran probabilidad de hacerlo.

SECUENCIA (CAG)_n EXPANDIDA

En este trabajo fueron estudiados los cromosomas de 6 miembros de una familia con claros antecedentes de la enfermedad. La prueba de PCR fue eficiente para amplificar correctamente y en el primer ensayo las muestras 1, 2, 3 y 4 del árbol genealógico que se muestra (figura 9). Las muestras 5 y 6 presentaron en la primera amplificación únicamente el alelo normal la primera, y sólo el expandido la segunda.

Como el DNA correspondiente a la muestra 1 pertenece a la esposa del abuelo afectado, esperábamos encontrar genes de tamaño normal para esta persona. El producto del PCR de la muestra 1 presentó dos marcas intensas de 250 y 238 pb, lo que corresponde a alelos de 19 y 15 repetidos respectivamente, tal y como se esperaba.

La amplificación de las muestras 2, 3 y 4 reveló para cada una un alelo expandido y otro en el rango normal. Se ha reportado que en promedio el tamaño de la expansión de personas que presentan la forma típica de la enfermedad, se encuentra entre 42 y 43 copias CAG (24). Para los pacientes 2, 3 y 4, que actualmente presentan la sintomatología característica de la enfermedad, se les determinaron tamaños expandidos de 44, 42 y 43 CAG repetidos respectivamente, y el inicio del padecimiento se encontró alrededor de los 42 años, tal y como se ve en la mayor parte de los pacientes reportados en otros países. Comprobamos que la expansión es la causa de la Enfermedad de Huntington de estas personas así como también del inicio de ésta.

La cuarta hermana de los pacientes anteriores, que está señalada como 5 en la figura 9, inicialmente presentó sólo una marca intensa de tamaño normal, de aproximadamente 244 pb; para descartar que se tratara de una persona homocigota con dos alelos normales del mismo tamaño, o que presentara una expansión tan grande en sus cromosomas que por su tamaño no pudiera ser amplificada correctamente, su DNA fue tratado con GeneClean para limpiarlo. Lo mismo se hizo con la muestra de la paciente 6 ya que inicialmente en el producto amplificado se detectaba sólo el alelo expandido.

El tratamiento con GeneClean de estos DNA's disminuyó la cantidad de proteínas de las muestras (relación de absorbancias 260/280 > 1.5), y se volvió a realizar el PCR. En un segundo ensayo tampoco pudimos determinar los alelos faltantes, por lo que se aumentó la concentración de DNA para ambos casos y se probó por tercera vez.

Después de esta prueba fue posible detectar los dos alelos normales de la muestra 5. Se determinó que presenta dos alelos en el rango normal de 18 y 16 tripletes repetidos. Debido a la pequeña diferencia que existe entre ellos, en la primera prueba no fue posible detectarlos separados, y sólo se observaba una gran marca. Para determinar si una persona es homocigota normal, es necesario entonces, tener una muestra de DNA muy limpia para que la amplificación sea lo más específica posible. También es muy importante determinar la cantidad de DNA que se va a usar, ya que si éste se encuentra en exceso provocará amplificadas en cantidad tal que no permitan distinguir estas pequeñas diferencias.

Para la muestra 6, en la que únicamente se detectaba el alelo expandido, hubiéramos podido pensar que se tratara de una persona con dos alelos expandidos, es decir homocigota para el gen afectado, sin embargo esta idea fue descartada por ser la hija de una padre enfermo, por lo que la no paternidad no era posible, ya que su madre no tiene antecedentes familiares. Por lo tanto, la única razón de este resultado se debió a alguna falla de la técnica de PCR para amplificar el alelo normal. Esto parece contradictorio ya que se ha reportado que la región difícil de amplificar es la de la expansión, mientras que los alelos normales son relativamente sencillos de detectar. Hasta la fecha no hemos podido explicar como es que en nuestra reacción pudimos amplificar varias veces un cromosoma con una expansión tan grande de 54 repetidos y no así el cromosoma normal de la misma muestra que contiene 18 unidades CAG.

En el estudio de esta familia pueden establecerse tres puntos importantes. Primero, para todos los casos de pacientes se encontraron alelos normales y afectados. Estos alelos normales que fueron heredados de la madre normal, para las muestras 2,3 y 4 se esperaba que tuvieran la misma longitud que la de alguno de los 2 que presenta la madre heterocigota (19 y 15 copias), sin embargo sólo el alelo normal del paciente 3 tiene el cromosoma normal materno con 19 repetidos, y los otros dos hermanos afectados tienen alelos normales de 17 copias. Debido a que el alelo expandido lo heredaron de su padre, estos cromosomas normales con 17 unidades no pudieron haber descendido por vía paterna. Para descartar que las muestra se hubieran confundido, se volvieron a analizar. Después de 2 ensayos más se determinó el mismo resultado, por lo que creemos que existió una variación del número de tripletes repetidos en los cromosomas normales de la madre al heredarlos a sus hijos. No sabemos si esta variación que detectamos es la "normal" que ocurre al transmitirse los alelos normales y que provocan el polimorfismo existente en todas las personas del mundo, o si es consecuencia de la expansión que los alelos afectados sufren.

La última hermana que se encontraba como individuo en riesgo también tiene diferencias con los alelos normales de la madre, ya que no presenta ni 19 ni 17 copias. Sin embargo uno de estos alelos es el normal que heredó de su padre. Tampoco sabemos si hubo variación de su madre a ella o si es causa de la técnica que provocó que leyéramos 18 copias en lugar de 19, ó 16 en lugar de 15.

Independientemente del tamaño del alelo normal, los pacientes a los que pudimos detectar en un 100% alelos expandidos, hemos comprobado que el origen de su enfermedad es debido a esta mutación de expansión de sus tripletes CAG. Una expansión "promedio" provocó una forma típica de la enfermedad en los 3 hermanos con inicio adulto. Además, la superexpansión también concuerda con la edad temprana (10 años) a la que la paciente 6 comenzó los síntomas.

Aunque claramente se observa esta relación inversa de la edad de inicio y el tamaño de la expansión, no podemos decir la edad a la que una persona con una cierta expansión, comenzará a padecer los síntomas, ya que aunque nuestra muestra afectada es muy pequeña se presentan diferencias en la edad de inicio de 2 años con sólo un triplete de diferencia en la expansión, por lo que además de ésta, otros factores, tal vez ambientales, determinan el inicio.

Finalmente hemos comprobado como esta enfermedad presenta una marcada anticipación al transmitirla a las siguientes generaciones. Desgraciadamente no fue posible el estudio del DNA del abuelo afectado, ya que se hubiera tenido un patrón definido de como el gen ha sufrido la inestabilidad entre las generaciones de esta familia. El alelo más grande de los hermanos analizados fue el que generó una superexpansión, asociado además al sexo de este padre transmisor. Comprobamos, que en esta familia la enfermedad presenta un patrón de herencia dominante (como se observa en el árbol genealógico); que la enfermedad es causada por la expansión de la secuencia inestable CAG del primer exón del gen IT15; que una expansión muy grande provoca casos juveniles de la enfermedad y que ésta se presentó al heredarse de un varón afectado; y que aunque existe variación en los cromosomas normales es muy pequeña (2 tripletes) y se mantiene dentro del estado normal.

Como es posible observar no se tiene la suficiente información, además de la que proporciona el estudio de la mutación del gen acerca del fenotipo de la persona enferma; es decir, hemos podido determinar, mediante diagnóstico predictivo, si una persona heredó

la expansión que le causará la enfermedad, pero no podemos conocer cuando iniciará ni como evolucionará, cuáles serán primeros síntomas, etc. Debido a que además de que parecen existir factores que afectan la presentación de la enfermedad, independientemente del tamaño de la expansión, existe también un mosaicismo somático sobre todo del sistema nervioso central, que aunque es pequeño pudiera estar influyendo en el diferente fenotipo de personas con igual número de repetidos detectados en su sangre periférica. Además, en nuestro país, los pacientes acuden a consulta únicamente cuando los síntomas son claramente evidentes y por lo general el momento exacto de inicio de la enfermedad lo desconocen.

Puede ser que exista una relación proporcional (tal vez lineal) del momento exacto en que la muerte neuronal comienza y el número de tripletes repetidos en la expansión, lo que nos daría una mayor información sobre una posible predicción de la edad de inicio del padecimiento. Sin embargo, hasta la fecha no se han llevado a cabo estudios de este tipo por lo que esta hipótesis no ha sido probada.

RANGOS NORMALES Y AFECTADOS EN LA POBLACION ESTUDIADA

Como se ha determinado en este estudio, el rango de unidades CAG en la población analizada va de 13 a 32 repetidos en los cromosomas normales, tanto de los controles como de los no afectados en los 4 pacientes que presentan la expansión. Esto provoca dos grupos de cromosomas: los normales y los afectados, entre los que no existe traslape de repeticiones CAG, y son por lo tanto perfectamente distinguibles uno del otro.

Debido a que el alelo mayor normal encontrado contiene 32 repetidos y el expandido menor de la familia afectada presentó 42, existe una zona de 9 repetidos no detectados, que no son normales ni afectados. De estos alelos intermedios es posible que los cercanos a 40 unidades provoquen la enfermedad, ya que se sabe que para otras poblaciones hay expandidos tan pequeños como de 36 unidades CAG responsables del padecimiento (55). Tomando en cuenta este valor, los restantes alelos de 33 a 35 repetidos quedarían como premutados para nuestra población pudiendo ser muy propensos a la expansión durante su transmisión a las siguientes generaciones, debido a la inestabilidad a la que han sido asociados, provocando casos esporádicos de la enfermedad.

El tramo CAG de los cromosomas mutados es muy inestable cuando se trasmite por vía paterna a la siguiente generación, debido a que el número de repetidos es muy diferente entre las células germinales de los varones afectados, es decir, son células con un gran mosaicismo. Este hecho fue confirmado en este estudio, ya que la hija (caso no. 6) de un varón afectado presentó un cambio muy brusco en el número de repetidos de los que presenta su padre y los que ella presenta en sus células.

Aunque todavía se desconocen los mecanismos que dan lugar a la expansión de estas secuencias triples repetidas, se ha postulado que dichas expansiones están ligadas a una replicación aberrante del DNA durante las divisiones meióticas celulares que producen los óvulos y espermatozoides, o en la rápida división celular de las etapas tempranas de vida embrionaria. Se piensa que las copias extra de repetidos CAG pudieran ser incorporadas por error durante la reparación del DNA, en el que el sistema encargado cayera en "confusión" por la cantidad normal de repetidos y terminara adicionando muchas más copias de las necesarias. Y la última explicación que se ha dado se refiere a que las enzimas reparadoras se vieran por alguna razón sobreactivadas (42).

Debido a que las células que presentan la mayor inestabilidad de estas secuencias CAG repetidas en la Enfermedad de Huntington son los espermatozoides, que se producen masivamente, se ha sugerido que en las divisiones meióticas rápidas que dan lugar a estas células germinales, se den muchos más errores en la replicación, provocando poblaciones celulares con una gran variedad de alelos expandidos, por lo que de esta forma pudieran explicarse los casos juveniles y esporádicos de hijos de varones afectados o portadores de premutaciones (34).

Es posible que en las células de mujeres afectadas exista también un mosaicismo considerable, sin embargo la cantidad de células viables de la ovogénesis es incompatible con una gran población celular, además de que el tiempo en el que una célula afectada es factible de ser fecundada no es comparable al que los espermatozoides presentan, por lo que es entendible que sean los varones los responsables de estas mayores variaciones. Desgraciadamente, los espermatozoides acarreadores de una superexpansión (más de 50 copias CAG), no tienen ninguna restricción en su capacidad para fecundar al óvulo, por lo que tienen la misma posibilidad de formar un nuevo ser que los espermatozoides normales (24).

7. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de la determinación de los grupos sanguíneos en este estudio, son muy similares a los reportados por Lisker y colaboradores, que han medido y caracterizado los rasgos genéticos de la población mestiza mexicana; por lo que concluimos que la muestra analizada en este estudio representa adecuadamente la población mexicana normal.
2. El ensayo de PCR es una técnica sumamente útil que permite el estudio directo del gen de la Enfermedad de Huntington, de muestras de DNA, que aunque presenten degradación, si tienen una buena concentración de DNA íntegro (aproximadamente 100 ng/ μ l), amplificará el segmento de interés adecuadamente.
3. El gen IT15, responsable de la Enfermedad de Huntington se presenta como altamente polimórfico en nuestra población; la variación de las unidades en las que se encuentra repetida la secuencia CAG cercana al extremo 5' es alta, y se han podido detectar 18 diferentes alelos normales en esta región.
4. El rango que se establece como normal para la población mexicana va de 13 hasta 32 repetidos, siendo los alelos más frecuentes los de 14 a 22 copias (CAG)_n.
5. Los individuos afectados, pertenecientes a una familia mexicana con antecedentes de la Enfermedad de Huntington, presentan todos un alelo de tamaño normal y otro expandido.
6. Debido a que el rango normal establecido de copias es de 13 repetidos y hasta 32, y considerando que posiblemente los valores cercanos a 40 unidades repetidas pudieran causar el fenotipo afectado (36 han provocado la enfermedad en otros países), determinamos que los alelos de 33 a 35 CAG para nuestra población, dan lugar a cromosomas premutados altamente inestables que son capaces de expandirse en la siguiente generación. Este hecho posiblemente haya sucedido con el caso supuestamente normal al que detectamos un alelo expandido que no presenta antecedentes, que bien pudiera corresponder a un caso esporádico

generado de la expansión de uno de estos alelos intermedios heredado de alguno de sus padres.

7. El tramo CAG repetitivo de los cromosomas de pacientes con Enfermedad de Huntington de una familia mexicana con antecedentes, es considerablemente mayor que el que se detectó en la población normal. Es posible concluir entonces que la expansión detectada en los miembros de esta familia es la causante del padecimiento.
8. Un individuo en riesgo (muestra 5, figura 9 y fotografía 9) que presentó dos alelos normales no desarrollará la enfermedad.
9. Una paciente con una superexpansión de 54 copias presentó inicio temprano de la enfermedad (a los 10 años de edad), por lo que pudimos comprobar la relación inversa que existe entre el tamaño de la expansión de esta secuencia (CAG)_n y una presentación más temprana del padecimiento y una más rápida progresión. Por lo tanto, además de ser esta expansión CAG la causante del padecimiento también influye de manera evidente en la edad de la presentación de los primeros síntomas y la evolución.
10. Aunque las muestras afectadas que se estudiaron en este trabajo son muy pocas y los resultados no sean estadísticamente significativos, podemos decir que la principal causa, si no es que la única, que provoca la Enfermedad de Huntington en estos pacientes analizados, es la expansión anormal de la secuencia CAG del gen IT15, más allá del límite normal alto de 32 copias.
11. Con la prueba de PCR para la medición directa del tamaño del gen IT15 y el establecimiento de un rango normal para nuestra población, es posible realizar diagnóstico predictivo a personas en riesgo, con un 100% de seguridad cuando los alelos que presenten no caigan dentro de un rango premutado.

8. REFERENCIAS

1. Alonso M.E., Nieto D. Aspectos Clínicos y Genéticos de la Enfermedad de Huntington. Estudio de 28 Pacientes. *Rev Invest Clin* 1985; 37:125-130.
2. Alonso M.E., Gómez L., Otero E. Importance of Hereditary Disease at a Neuropsychiatric Institute in Mexico. *Genet Epidemiol* 1989; 6: 589-595.
3. Alonso M.E., Martínez C., Otero E. Enfermedad de Huntington, Estudio Clínico Genético de 66 Familias. *Arch Inst Nac Neurol* 1991; 6: 137.
4. Andrew S.E., Goldberg P., Kremer B., et al. The Relationship Between Trinucleotide (CAG)_n Repeat Length and Clinical Features of Huntington's Disease. *Nature Genet* 1993; 4: 398-403.
5. Arnheim N., Erlich H. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 131-156
6. Barron H. Lillas, et al. A Study of the Huntington's Disease Associated Trinucleotide Repeat in the Scottish Population. *J Med Genet* 1993; 30:1003-1007.
7. Bates G., Lehranch H. Trinucleotide Repeat Expansions and Human Genetic Disease. *BioEssays* 1994; 16:277-284.
8. Biaoyang L., Rommens J., Graham R., et al. Differential 3' Poliadenilation of the Huntington's Disease Gene Results in Two mRNA Species with Variable Tissue Expression. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1541-1545.
9. Brook D. Retreat of the Repeat? *Nature Genet* 1993; 3: 279-281.
10. Committee on DNA Technology, American Society of Human Genetics. DNA Banking and DNA Analysis: Points to Consider. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 781-783.
11. Craufurd D., Dodge A. Mutation Size and Age at Onset in Huntington's Disease. *J Med Genet* 1993; 30: 1008-1011.
12. De Rooij K., De Koning P., Skraastad M., et al. Dynamic Mutation in Dutch Huntington's Disease Patients: Increased Paternal Repeat Instability Extending to within the Normal Size Range. *J Med Genet* 1993; 30: 996-1002.

13. Duyao M., Ambrose C., Myers R., et al. Trinucleotide Repeat Length Instability and the Age of Onset in Huntington's Disease. *Nature Genet* 1993; 4: 387-392.
14. *Genome Analysis. A Practical Approach. Capitulo 6 The Polymerase Chain Reaction.* Edited by K.E. Davies. IRL PRESS. Oxford University Press 1990; 141-152
15. Goldberg P., Andrew S., Clarke L., et al. A PCR Method for Accurate Assessment of Trinucleotide Repeat Expansion in Huntington's Disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 635-636.
16. Goldberg P., Andrew S., Theilmann J., et al. Familial Predisposition to Recurrent Mutations Causing Huntington's Disease: Genetic Risk to Sibs of Sporadic Cases. *J Med Genet* 1993; 30: 987-990.
17. Gusella F.J. Genetic Linkage of the Huntington's Disease Gene to a DNA Marker. *Can J Neurol Sci* 1984; 2: 421-425.
18. Gusella F.J., MacDonald M.E. Huntington's Disease and Repeating Trinucleotides. *New Engl J Med* 1994; 330:1450-1451.
19. Hall J. Genomic Imprinting: Review and Relevance to Human Diseases. *Am J Hum Genet* 1990; 40: 857-873.
20. Harper S.P. The Epidemiology of Huntington's Disease. *Hum Genet* 1992; 89: 365-376.
21. Harper S. P. A Specific Mutation for Huntington's Disease. *J Med Genet* 1993; 30: 975-977.
22. Hayden M. Amplification of the Trinucleotide (CAG)_n Repeat in the HD Gene. The University of British Columbia (1993) Comunicación Personal.
23. Hoffman E.P., Jaffurs D., An Expanding Enigma. *Curr Biol* 1993; 3: 456-459.
24. Huntington's Disease Collaborative Research Group. A Novel Gene Containing a trinucleotide Repeat that is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-983.
25. Kremer B., Weber B., and Hayden M. New Insights into the Clinical Features, Pathogenesis and Molecular Genetics of Huntington's Disease. *Brain Pathol* 1992; 2: 321-335.

26. Kremer B., Squitieri F., Andrew S., et al. Molecular Analysis of Late Onset Huntington's Disease. *J Med Genet* 1993; 30: 991-995.
27. Kemer B., Goldberg P., Andrew S., et al. A Worldwide Study of the Huntington's Disease mutation the Sensitivity and Specificity of Measuring CAG Repeats. *The New Engl J Med* 1994; 330: 1401-1406.
28. Kurlan R. Clinical Impact of Recombinant DNA Research on Neurogenetic Diseases (Report od Mary Jennifer Selsznick Workshop Organized by the Hereditary Disease Foundation). *Arch Neurol* 1985; 42: 82-84.
29. Laird D. Proposed Genetics Basis of Huntington's Disease. *Trends Genet* 1990; 6: 242-247.
30. Landegren U. Molecular Mechanism of Nucleic Acid Sequence Amplification. *Trends Genet* 1993; 9: 199-204.
31. Lisker R. Estructura Genética de la Población Mexicana. Aspectos Médicos y Antropológicos Capítulos I y II. Ediciones Salvat México, 1981; 1-40
32. Lisker R., Pérez-Briceño R., Granados J., et al. Gene Frequencies and Admixture Estimates in a Mexico City Population. *Am J Phys Anthropol* 1986; 71: 203-207.
33. Lisker R., Pérez- Briceño R., Granados J., et al. Gene Frequencies and Admixture Estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am J Phys Anthropol* 1988; 76: 331-335.
34. MacDonald M., Barnes G., Srinidhi J., et al. Gametic but not Somatic Instability of CAG Repeat Length in Huntington's Disease. *J Med Genet* 1993; 30: 982-986.
35. MacIntosh I., Curtis A., Millan F., et al. Prenatal Exclusion Testing for Huntington's Disease Using Polymerase Chain Reaction. *Am J Med Genet* 1989; 32: 274-276.
36. MacMillan J.C., et al. Identification of an Expanded CAG Repeat in the Huntington's Disease Gene (IT15) in a Family Reported to Have Benign Hereditary Chorea. *J Med Genet* 1993; 30: 1012-1013.
37. MacMillan J., Quiin N. 15th International World Federation of Neurology Workshop on Huntington's Disease. Massachusetts, USA. *J Med Genet* 1993; 30: 1039-1041.
38. Madox J. Triplet Repeat Genes Raise Questions. *Nature* 1994; 68: 685.

39. Mandel J. L. Questions of Expansion. *Nature Genet* 1993; 4: 8-9.
40. Martin J.B. Molecular Genetics of Neurological Diseases. *Science* 1993; 262: 674-676.
41. Morell V. Huntington's Gene Finally Found. *Science* 1993; 260: 28-30.
42. Morell V. The Puzzle of the Triplet Repeats. *Science* 1993; 260: 1442-1443.
43. Mourant A. The Distribution of the Human Blood Groups. Capítulo 19 Gene Frequency Calculations. Blackwell Scientific Publications Oxford 1954.
44. Navarrete C., Salamanca F. Contribución al Estudio de los Mecanismos No Clásicos de Transmisión Mendeliana. Memorias del XVI Congreso Nacional de Genética Humana. Acapulco, México Noviembre 1991: 9.
45. Norremoelle A., Riess O., Epplen J., et al. Trinucleotide Repeat Elongation in the Huntingtin Gene in Huntington's Disease Patients from 71 Danish Families. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1475-1476.
46. Perkin Elmer Cetus. Manual Amplitaq Cycle Sequencing Kit Protocol. (1990): 1-35
47. Quirke P., Taylor G.R. PCR A Practical Approach. Edited by MacPherson M.J. Irl Press. Oxford University Press 1993. Capítulos 1 y 2: 1-49.
48. Reyniers E. The Full Mutation in the FMR-1 Gene of Male Fragile X Patients is Absent in their Sperm. *Nature Genet* 1993; 4: 143-146.
49. Riess O., Noerremoelle A., Asger S., et al. Improved PCR Conditions for the Stretch of (CAG)_n Repeats Causing Huntington's Disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 637.
50. Riggins J., Lokey L., Chastain J., et al. Human Genes Containing Polimorphic Trinucleotide Repeats. *Nature Genet* 1992; 2: 186-191.
51. Rommens J., Hutchinson G., Andrew S., et al. A Transcription Map of the Region Containing the Huntington's Disease Gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 901-907.
52. Rubinsztien D., Leggo J., Barton D., et al. Site of (CCG) Polimorphism in the HD Gene. *Nature Genet* 1993; 5: 214-215.

53. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors (DNA Polymerase/Nucleotide Sequences/Bacteriophage ϕ X174). *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
54. Shi-Hua L., MacInnis M., Margolis R., et al. Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression and Length Polimorphisms. *Genomics* 1993; 16: 572-579.
55. Simpson S., et al. Huntington's Disease in Grampian Region: Correlation of the CAG Repeat Number and the Age of Onset of the Disease. *J Med Genet* 1993; 30: 1014-1017.
56. Snell R. The Analysis of the Expanded Trinucleotide Repeat Causing Huntington's Disease in 440 Patients from 269 Kindreds. *Am J Hum Genet* 1993; 53 (Suppl): 1231.
57. Snell R., MacMillan J., Chadle J., et al. Relationship Between Trinucleotide Repeat Expansion and Phenotypic Variation in Huntington's Disease. *Nature Genet* 1993; 4: 393-397.
58. Stine O., Pleasant N., Franz M., et al. Correlation Between the Onset Age of Huntington's Disease and Length of the Trinucleotide Repeat in IT-15. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1547-1549.
59. Strong V., Tagle D., Valdes J. Widespread Expression of the Human and Rat Huntington's Disease Gene in Brain and Nonneural Tissues. *Nature Genet* 1993; 5: 259-265.
60. Sutherland G.R., Richards R.I., Dynamics Mutations on the Move. *Journal of Medical Genet* 1993; 30: 978-981.
61. Telenius H., Kremer B., Theilmann J., et al. Molecular Analysis of Juvenile Huntington's Disease: the Major Influence on (CAG)_n Repeat is the Sex of the Affected Parent. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1535-1540.
62. Telenius H., Kremer B., Goldberg P., et al. Somatic and Gonadal Mosaicism of the Huntington's Disease Gene CAG Repeat in Brain and Sperm. *Nature Genet* 1994; 6: 409- 414.
63. Valdes J., Tagle D., Elmer L., et al. A Simple Non-Radioactive Method for Diagnosis of the Huntington's Disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 633-634.

64. Willloh R., Zükle C., Gerdes B., et al. PCR Analysis of a Three-Allelic Pvu II-RFLP at D4S127 Closely Linked to the Huntington's Disease Locus. *Clin Genet* 1993; 43: 321-323.
65. Wöhrle D. Stability of Fragile X Mutations in Differential Cells Indicates Early Post-Conceptional Trinucleotide Repeat Expansion. *Nature Genet* 1993; 4: 140-142.
66. Zühlke C., Riess O., Schröder K., et al. Expansion of the (CAG)_n Repeat Causing Huntington's Disease in 352 Patients of German Origin. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1467-1469.