



**Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Química**



**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS EN LOS EXONES 2, 6 Y 7
DEL GEN *PANK2* EN PACIENTES CON PROBABLE HUNTINGTON-LIKE**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

SÁNCHEZ MONCADA GABRIELA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2018



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: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
VOCAL: Profesor: ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ
SECRETARIO: Profesora: PETRA YESCAS GÓMEZ
1er SUPLENTE: Profesor: JAVIER AXOSCO MARÍN
2do SUPLENTE: Profesora: LIZBETH ESMERALDA GARCÍA VELÁZQUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL VELASCO SUÁREZ"

ASESOR DEL TEMA
DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

SUSTENTANTE:
SÁNCHEZ MONCADA GABRIELA

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN:	10
3. INTRODUCCIÓN.	12
3.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	12
3.1.1 Historia de la Enfermedad de Huntington.....	12
3.1.2 Gen <i>HTT</i>	13
3.1.3 La proteína Huntingtina.....	15
3.1.4 Etiología:	17
3.1.6. Síntomas.....	23
3.1.7 Diagnóstico.....	26
3.1.8 Imagenología.....	27
3.1.9 Prevención.....	28
3.1.10 Tratamiento.	28
3.1.11 Fenocopias de la Enfermedad de Huntington.	30
3.2 ENFERMEDAD DE HALLERVORDEN-SPATZ	40
3.2.1 Historia de la Enfermedad de Hallervorden-Spatz.....	40
3.2.2 Gen <i>PANK2</i>	41
3.2.2 Proteína pantotenato cinasa.....	43
3.2.4 Estrés oxidativo.....	44
3.2.5 Coenzima A.....	45
3.2.6 Cisteína.....	49
3.2.7 El hierro.....	50
3.2.8 Los ganglios basales.	51
3.2.9 Neurodegeneraciones con acumulación cerebral de hierro.....	53
3.2.10 Los genes asociados son:	53
3.2.11 Etiología de la enfermedad de Hallervorden Spatz.	56
3.2.12 Formas clínicas de presentación:	57
3.2.13 Epidemiología.....	59
3.2.14 Síntomas.....	59
3.2.15 Diagnóstico.....	61
3.2.16 Imagenología.....	61

3.2.17 Retinopatía pigmentaria (RP).....	63
3.2.18 Tratamiento.....	64
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	65
5. HIPÓTESIS.....	66
6. OBJETIVO.....	66
7. METODOLOGÍA.....	66
7.1 Población de estudio.....	68
7.2 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica.....	69
7.3 Cuantificación del DNA.....	70
7.4 Análisis de la integridad del DNA.....	71
7.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	71
7.6 Análisis de productos de PCR.....	74
7.7 Purificación de los productos de PCR.....	75
7.8 Reacción de secuenciación.....	76
7.9 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación.....	77
7.10 Secuenciación automatizada.....	78
7.11 Análisis de la secuencia.....	78
8. RESULTADOS.....	78
8.1 Análisis de la integridad del DNA.....	78
8.2 Análisis de los productos de PCR.....	79
8.3 Variantes génicas de los exones 2,6 y 7 del gen <i>PANK2</i>	80
8.3.1 Electroferograma del exón 2.....	81
8.3.2 Electroferograma del exón 6.....	82
8.3.3 Electroferograma del exón 7.....	82
8.4 Variantes encontradas.....	84
8.4.1 Paciente con PKAN clásica.....	84
8.4.2 Paciente con PKAN atípica.....	86
8.5 Mutaciones identificadas.....	88
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	89
10. CONCLUSIONES.....	94
11. ANEXO 1.....	95
12. BIBLIOGRAFIA:.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Localización cromosómica del gen <i>HTT</i> en el cromosoma 4.....	14
2. Los caminos posibles de fragmentación de la huntingtina mutada.....	16
3. Expansiones moderadas de CAG en exones y expansiones extensas intrónicas de secuencias repetidas, comparadas con el número normal de repeticiones..	18
4. Relación entre el número de tripletes CAG en los pacientes con enfermedad de Huntington y la edad de inicio de los síntomas.....	20
5. Distribución de los números de tripletes repetidos (CAG) en la población inglesa comparada con la japonesa y la africana del sur.....	22
6. Imagen coronal FSPGR del cerebro de un paciente con Huntington comparada con un control sano.....	28
7. Localización cromosómica del gen <i>PANK2</i> en el cromosoma 20, posición 13.....	42
8. Estructura de la Coenzima A y las partes que la componen.....	46
9. Etapas de la Biosíntesis de la coenzima A siendo interrumpida por un déficit en la enzima pantotenato cinasa.....	48
10. Ganglios basales y los núcleos que lo componen.....	52
11. Resonancia magnética (Ojo de Tigre) que muestra el contenido de hierro del globo pálido aumentado en el paciente con PKAN, comparado con un portador de la mutación en un alelo del gen <i>PANK2</i> y un control sano.....	62
12. Comparación entre el ojo de un individuo sano y un paciente con retinosis pigmentaria, dónde se encuentran los depósitos de pigmentos conocidos como “espículas óseas”.....	63
13. Termociclado utilizado para llevar a cabo la amplificación de los exones 2, 6 y 7 del gen <i>PANK2</i> mediante la técnica de PCR.....	74
14. Termociclado utilizado para llevar a cabo la reacción de secuenciación de los exones 2, 6 y 7 del gen <i>PANK2</i>	77
15. Gel de agarosa al 1%, mismo que muestra la integridad del DNA genómico en diferentes muestras.....	79
16. Producto de PCR analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%	

empleando dos enzimas taq polimerasa para su amplificación, dónde se observa los amplicones de los exones 2, 3, 6 y 7.....	79
17. Electroferograma de la secuencia del exón 2 de 498 pb y parte de la zona intrónica, en las que no se encontraron variantes génicas.....	81
18. Electroferograma de la secuencia del exón 6 de 284 pb y parte de la zona intrónica, en las que no se encontraron variantes génicas.....	82
19. Electroferograma de la secuencia del exón 7 de 201 pb y parte de la zona intrónica, en las que no se encontraron variantes génicas.....	82
20. PCR de los exones 1, 2, 3, 5, 6 y 7 de los dos pacientes anteriormente mencionados.....	83
21. Electroferogramas parciales del exón 3 (PKAN clásica).....	84
22. Resonancia magnética T2 de paciente masculino de 6 años de edad.....	85
23. Electroferogramas parciales del exón 3 (PKAN atípica).....	86
24. Resonancia magnética T2 de paciente masculino de 24 años de edad.....	87
25. A) Segmento de la secuencia normal, B) Segmento de la secuencia del paciente donde se muestra el codón de paro que se forma al presentarse dos deleciones.....	90
26. A) Fragmento de la secuencia normal, B) Fragmento de la secuencia del paciente donde se observa el cambio de nucleótido de citosina a timina, lo que provoca el cambio en el aminoácido.....	91
27. A) Estructuras de la proteína pantotenato cinasa, B) Fragmento de la pantotenato cinasa, dónde se observa el aminoácido R357.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

1. Enfermedades producidas por expansión de trinucleótidos repetidos de tipo I y tipo II.....	19
2. Estimaciones preliminares recientes de la relación entre las copias CAG y el resultado probable de EH.....	21
3. Enfermedades autosómicas recesivas (HDL3) y ligadas al cromosoma X causantes de corea.....	33
4. Enfermedades autosómicas dominantes causantes de corea.....	34
5 Genes relacionados con la NBIA, sus localizaciones en el genoma y dónde se expresa en el organismo.....	43
6. Secuencias de los oligonucleótidos del gen <i>PANK2</i> utilizados para la amplificación de los siete exones de los últimos pacientes, y sus temperaturas de alineamiento.....	72
7. Protocolo PCR con la enzima Kapa2G Robust HotStar Ready Mix, condiciones que establece el proveedor.....	73
8. Reactivos empleados para llevar a cabo la reacción de secuenciación de los exones 2, 6 y 7 del gen <i>PANK2</i>	76
9. Mutaciones identificadas en el gen <i>PANK2</i> en las muestras analizadas y características de los portadores.....	88

1. ABREVIATURAS

AD – Autosómica dominante

ADP – Adenosín difosfato

AR – Autosómica recesiva

Arg - Arginina

ARNt – Ácido ribonucleico de transferencia

ATP - Adenosín trifosfato

ATP13A2 – ATPasa de la subfamilia P5

ATXN – Ataxina

BLGR – Buffer para la lisis de glóbulos rojos

cAMP – AMP cíclico

CHMP2B – Proteína corporal multivesicular cargada 2B

CoA – Coenzima A

COASY – Sintetasa de CoA

CP - Ceruloplasmina

CREB – Proteína responsable de la unión a AMP cíclic

Cys - Cisteína

C9orf72 – Marco de lectura abierta 72 del cromosoma 9

DCAF17 – Factor 17 asociado a CUL4

DFT – Demencia frontotemporal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfatados

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

EH - Enfermedad de Huntington

ELA – Esclerosis lateral amiotrófica

FA2H – 2-Hidroxilasa de ácidos grasos

FSPGR – Eco gradiente rápido degradado
FTL – Cadena ligera de ferritina FXN – Proteína frataxina
g - Gramos
GABA – Ácido gamma aminobutírico
GAB - enzima ácido descarboxilasa
Gln - Glutamina
Gly - Glicina
GRN – Precursor de la granulina
HDL – Enfermedad Huntington-like (del inglés Huntington Disease Like)
His - Histidina
HSF –Human Splicing Finder
HTT – Gen de la huntingtina
H₂O₂ – Peróxido de hidrógeno
JPH3 – Gen de la juntofilina
KCl – Cloruro de potasio
KHCO₃ – Bicarbonato de potasio
K₂HPO₄ – Fosfato ácido de potasio
LDL – Lipoproteínas de alta densidad
Leu - Leucina
M – Molar
mg - miligramos min - Minutos mM - Milimolar mL – Mililitros
MPT – proteína Tau asociada Microtúbulos
NaCl – Cloruro de sodio
NaH₂PO₄- fosfato diácido de sodio o bifosfato de sodio
NBIA – Neurodegeneración por acumulación de hierro en el cerebro
NCBI – Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés National Center for Biotechnology Information)
NH₄Cl – Cloruro de amonio
nm - Nanómetro

OH• - Radical hidroxilo

O₂•⁻ - Anión superóxido

PANK2 – Pantotenato cinasa pb: Pares de base

PB – Amortiguador de fosfatos

PBI – Índice de tamponamiento de fósforo (del inglés Phosphorus Buffernig Index)

PBS – Amortiguador fosfato salino (del inglés phosphate buffered saline)

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PKAN – Neurodegeneración asociada a la pantotenato cinasa

PLA2G6 – Neurodegeneración asociada a la fosfolipasa A2

PoliQ – Tractos de poliglutaminas

PPC - 4'- fosfo-N-pantotenoilcisteína

PRNP – Gen de la proteína Prion

Pro - Prolina

PrP – Proteína Prión

PrPC – Proteína prión celular o normal

PrPSc – Proteína prión patológica o escrapie

RM – Resonancia magnética

ROS – Especies reactivas de oxígeno RP – Retinopatía pigmentaria

rpm – Revoluciones por minuto

SCA – Ataxia espinoocerebelosa

SDS – Dodecilsulfato de sodio

SH- - Grupo sulfhidrilo

SNC – Sistema nervioso central

TARDBP – Proteína de unión a DNA TAR

TBP – Proteína de unión a la caja TATA

T_m – Temperatura media de desnaturalización de los oligonucleótidos

Trp – Triptófano

T₂ – Tiempo de relajación transversal

V - Voltio

Val - Valina

UV - Ultravioleta

WDR45 – Proteína WD40

°C – Grados centígrados

μL – Microlitro

ng – Nanogramo

2. RESUMEN:

La enfermedad de Huntington (EH), es un trastorno neurodegenerativo hereditario con una herencia autosómico dominante, por lo que existe un riesgo del 50% de heredar el gen mutado. Se caracteriza por alteraciones del movimiento como la corea, del comportamiento y deterioro cognitivo progresivo. La EH es resultado de una variante génica en el gen *HTT* que provoca modificaciones estructurales en la proteína huntingtina, debido a la expansión de un repetido CAG, estas modificaciones predisponen la muerte neuronal en diversas áreas del cerebro, con predominio en los núcleos de la base.

A partir del año 2000 se comenzaron estudios que describían diversos trastornos con un cuadro similar a la EH, a estos trastornos se les conoce como fenotipos similares a la Enfermedad de Huntington (del inglés Huntington-like) o también fenocopias de EH. A la fecha se han descrito diferentes padecimientos o enfermedades de origen genético que presentan manifestaciones similares a la EH, algunas de ellas se nombran también con las siglas HDL, como: *PRNP* (HDL1), *JPH3* (HDL-2), *TBP* (HDL4). Otros genes que presentan manifestaciones similares son: *ATXN1*, *ATXN2* y *ATXN3* (ataxias espinocerebelosas 1,2 y 3, respectivamente), *FXN* (ataxia de Friedreich), *PANK2* (deficiencia de pantotenatocinasa), *C9orf72*, (marco abierto de lectura 72 del cromosoma 9), *GRN* (precursor de la granulina), *TARDBP* (proteína de unión a DNA TAR), *MAPT* (proteína Tau asociada a microtúbulos) y *CHMP2B* (proteína corporal multivesicular cargada 2B) genes asociados a la demencia frontotemporal (DFT), entre otros.

El gen *PANK2* se encuentra en el cromosoma 20 locus 20p13, está compuesto por 34761 pares de bases que conforman 7 exones y codifica para la proteína pantotenatocinasa, ésta se localiza en de las mitocondrias y su principal función es la biosíntesis de la Coenzima A (CoA), a partir de la vitamina B5, esta coenzima participa en diferentes vías metabólicas.

Algunas mutaciones del gen *PANK2* inducen un déficit o ausencia de la proteína funcional, por lo que el organismo no produce la cantidad suficiente de CoA. Estos niveles bajos ocasionan que se deposite hierro y cisteína en las neuronas, dichas sustancias se oxidan y dan lugar a una exacerbada producción de radicales libres que predisponen la muerte neuronal. Asimismo, en la deficiencia de pantotenatocinasa (PKAN) antes conocida como la enfermedad Hallevorden-Spatz, se manifiesta un cuadro de distonía y otros trastornos del movimiento asociado a retinopatía pigmentaria y el signo imagenológico del “ojo de tigre” en la resonancia magnética.

En el presente estudio se analizaron 102 muestras de pacientes que presentaron resultados moleculares negativos para el gen de la huntingtina y en otros genes con alta frecuencia en Huntington-like, por lo que se continuó el estudio para evaluar la participación del gen *PANK2* y como estas variantes génicas influyen en el desarrollo de la enfermedad. Es por ello que se analizaron los exones 2, 6 y 7 del gen *PANK2* con base en los resultados del reciente estudio publicado en la población mexicana por González-Pérez (2013).

Los exones 2, 6 y 7 fueron analizados por secuenciación tipo Sanger, se emplearon los *primers* que bordean los sitios intrones/exones en busca de variantes génicas patológicas y polimórficas, también se hizo el análisis bioinformático de las variantes

Los resultados en el análisis de este gen fueron negativos en 100 pacientes para los tres exones estudiados, donde no se identificaron mutaciones ni polimorfismos y sólo en dos pacientes se encontraron en el exón 3 las mutaciones p.Ser392fr y p.Arg357Trp, con lo cual se confirmó el diagnóstico de PKAN. A pesar de que las mutaciones en este gen son muy raras, es importante incluirlo en el diagnóstico diferencial de los casos negativos a la EH.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

3.1.1 Historia de la Enfermedad de Huntington.

Es un trastorno neurodegenerativo descrito por primera vez en el año 1872 y publicado en *Medical and Surgical Reporter* por el médico estadounidense George Huntington a los 22 años de edad, el título de su artículo fue “On Chorea”, donde realizó una descripción precisa y clara de la enfermedad, lo que permitió identificar su incidencia familiar y que posteriormente atribuye su carácter hereditario. Inicialmente a la enfermedad se le denominó Corea de Huntington debido a que el principal síntoma era la corea (nombre que se le da por los movimientos involuntarios que asemejan una danza). Posteriormente, al tener mayor conocimiento del trastorno el nombre se modificó a Enfermedad de Huntington, ya que en las formas infantiles y juveniles la sintomatología es diferente.¹

Uno de los focos más importantes de la enfermedad se sitúa en Venezuela al este del lago Maracaibo, en la región de Zulia, donde Américo Negrete, médico neurólogo relacionó los síntomas de la enfermedad de Huntington con los lugareños “sanviteros”, es por ello que a las personas que padecían esta enfermedad se les denominaba con el “Mal de San Vito”, llamada así por el santo al que se evocaba para curar la enfermedad. El doctor Negrete publicó un libro con la descripción de la enfermedad, mismo que fue de gran ayuda para el descubrimiento del gen por el grupo *The Huntington’s Disease Collaborative*.

Por otro lado, la Dra. Nancy Wexler perdió a su madre y a su abuelo cuando era una niña, ellos padecieron de la enfermedad de Huntington en una época en que no se conocía lo suficiente de ella, por este motivo, en el año de 1970, la Dra. Wexler se propuso encontrar la cura junto a su padre Milton Wexler, un psicoanalista en los Ángeles, California en la Fundación de Enfermedades Hereditarias, una organización que él había creado para investigar el trastorno. En 1978 la Dra. Wexler obtuvo el financiamiento federal para la investigación de la Enfermedad de Huntington, por lo que se dirigió a la aldea venezolana en el Lago Maracaibo, donde

realizó un árbol genealógico de las familias venezolanas afectadas, integrando un grupo de 18,000 pacientes, la mayoría eran descendientes y familiares de una mujer llamada María Concepción.¹

El equipo de la Dra. Wexler, efectuó numerosos análisis sanguíneos y biopsias, además de diferentes pruebas motrices, ésto debido a la forma en que la enfermedad se transmite entre las familias. El equipo de Wexler determinó que se trataba de un único gen mutado y fue en el año 1983 cuando Gusella y cols. ubicaron la localización del gen responsable de la enfermedad en el cromosoma 4. Diez años más tarde se identificó el gen *HTT* en la región 4p16.3, determinándose que la expansión se debía de la secuencia del triplete CAG ubicado en el exón 1, este análisis lo realizó el Grupo de Investigación Colaborativo para la Enfermedad de Huntington, compuesto por 58 investigaciones en 6 grupos de búsqueda, utilizando el análisis de haplotipos por desequilibrio de ligamento; ahí se pudo evidenciar un pequeño segmento en 4p16.3 como la ubicación probable del gen defectuoso.²

3.1.2 Gen *HTT*.

También conocido como *HD* y anteriormente como *IT15*, fue el primer gen humano localizado por el análisis de ligamiento, usando fragmentos polimórficos de restricción (RFLP's) y desequilibrio de ligamiento. En cuanto al segmento de DNA fue detectado con una sonda llamada "G8" y renombrada "D4S10" en el séptimo taller de mapeo de genes humanos, en Los Ángeles en agosto de 1983, éste se localiza en la región telomérica del cromosoma 4.³

Por otro lado, Gusella y el grupo Colaborativo para la Enfermedad de Huntington (1993) encontraron una estrecha vinculación de la sonda G8 con la enfermedad de Huntington, en la gran familia venezolana y en una pequeña familia estadounidense, identificando una repetición (CAG)*n* expandida en el gen *HTT*, confirmándose la EH

al analizar los miembros afectados de 75 familias (provenían de una gran variedad de orígenes étnicos).³

La secuencia repetitiva CAG es inestable durante la transmisión intergeneracional con una alta tendencia a expandirse, demostrándose que grandes expansiones del triplete CAG ocurren en las transmisiones paternas, aunque también se han presentado en las maternas, aunque con menor frecuencia.⁴

Este gen se encuentra en el brazo corto (p) del cromosoma 4 en la posición 16.3 (4p16.3), tiene entre 3,074,681 y 3,243,960 pares de bases (Figura 1). Y codifica la proteína huntingtina, de la cual se desconoce la función exacta, se cree que desempeña un papel importante en las neuronas y es esencial para el desarrollo normal antes del nacimiento. La proteína huntingtina se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, con los niveles más altos de actividad en el cerebro. Dentro de las células esta proteína puede participar en la señalización química, el transporte de materiales, la unión a proteínas y otras estructuras, y la protección de la célula a la apoptosis.⁵

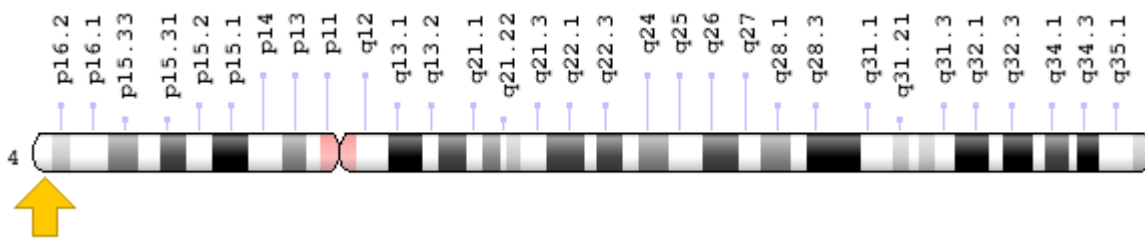


Figura 1: Localización cromosómica del gen HTT (señalado con flecha) en el cromosoma 4.⁵

3.1.3 La proteína Huntingtina.

Una proteína huntingtina silvestre consta de 3100 aa. Su función es desconocida, se expresa en células neuronales y no neuronales. Está formada de repeticiones de CAG, que codifica una cadena larga de glutamina (Q) a poca distancia de la metionina inicial.⁴

Al estar mutada y por consiguiente presentar un tamaño mayor, la proteína es más resistente a la proteólisis, lo que provoca que la proteína anormal se divida en fragmentos pequeños, que a su vez se unen entre ellos (tractos de poliglutaminas), éstos posiblemente son transportados al núcleo dónde se forman agregados, inclusiones intracelulares que tienen como resultado: interacciones patológicas proteína-proteína, apoptosis e inflamación. Con el proceso de la enfermedad se produce toxicidad por el exceso de glutamato que lleva a una deficiencia en la transmisión neuronal, ocasionando la muerte de las neuronas.⁴

La huntingtina mutada, o más específicamente su extremo amino-terminal con los tractos de poliglutaminas (poliQ), es reconocida como una conformación de plegamiento proteínico anormal y es proteolizada por caspasas específicas que pueden cortar el extremo N-terminal con los tractos poliQ y conducir a la agregación de estos fragmentos (Figura 2). Además, la proteína mutada o los mismos fragmentos pueden ser llevados a la degradación total a través del sistema de ubiquitina y proteasomas. Estos conceptos han sido reforzados por nuevas observaciones que demuestran que la huntingtina mutada y sus fragmentos con poliQ, alteran la función normal de factores de transcripción normales, como el factor de transcripción CREB (proteína que se liga al elemento de respuesta al cAMP), a través de su interacción con una proteína asociada con CREB y a la proteína p53. De esa manera, los fragmentos con poliQ obstaculizan o inhiben funciones reguladoras importantes dentro del núcleo celular. Hay evidencias recientes que avalan esta hipótesis y que explicarían la relación de la enfermedad con la edad; debido a que en las neuronas van decreciendo su actividad de degradación proteica

por las proteasomas, a medida que aumenta la edad y que debido a la imposibilidad de eliminar con una velocidad eficaz la huntingtina mutada, se van acumulando fragmentos poliQ en función directa a la edad. De esta forma, la mutación por expansión de tripletes repetidos va produciendo efectos acumulativos con la edad del paciente y por la “ganancia” de la función tóxica de sus extremos poliQ y la menor diferencia en la eliminación de la proteína normal.⁵ La función exacta de la proteína se desconoce, aunque tiene un papel importante en las células nerviosas, al que puede estar involucrada en la señalización, transporte, unión a proteínas y otras estructuras, además de proteger contra la apoptosis. Neuroquímicamente los niveles de la enzima ácido descarboxilasa (GAD) y del neurotransmisor GABA están disminuidos en los ganglios basales. En la espectroscopía por resonancia magnética en personas vivas afectadas por la enfermedad de Huntington, muestran altos niveles de lactato en los ganglios basales.⁶

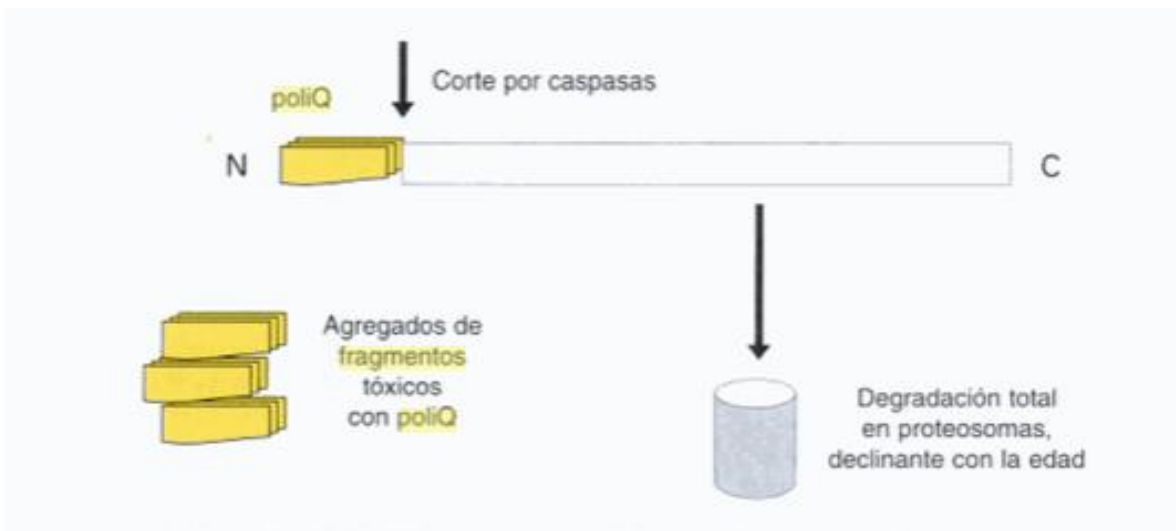


Figura 2: Los caminos posibles de fragmentación de la huntingtina mutada. Si la degradación total en los proteosomas declina con la edad, se acumulan los fragmentos tóxicos producidos por caspasas.⁶

3.1.4 Etiología:

La enfermedad de Huntington es un trastorno ocasionado por tractos de poliglutaminas, resultado de la expansión del trinucleótidos CAG mayor a 40 repetidos (penetrancia completa), menor a este número el funcionamiento de la proteína huntingtina es normal.⁷

El aumento de las repeticiones se produce porque en la cadena del DNA que contiene la región de tripletes CAG repetidos, puede adoptar una forma de horquilla en el momento en que se abre la doble hélice para la replicación, lo que provocará un “deslizamiento” de la DNA polimerasa y una adición o pérdida de varios nucleótidos en la cadena hija.⁴ Este deslizamiento origina un bucle en una de las cadenas, lo que provoca que la nueva cadena tenga una repetición más o una repetición menos que la cadena original, según haya sido el desplazamiento hacia atrás o hacia delante, respectivamente.⁸

La muerte celular programada en la enfermedad de Huntington, es un proceso que puede involucrar una serie de eventos relacionados como pueden ser:

- Excitotoxicidad.- Sobre-estimulación de células por sustancia químicas encontradas en el cerebro.
- Mecanismo de energía defectuoso.- Un defecto en la mitocondria, donde se produce la energía.
- Estrés oxidativo.- Actividad metabólica normal cerebral que produce radicales libres.
- Factores tróficos.- Sustancia químicas naturales encontradas en el cuerpo humano que pueden proteger contra la muerte celular.⁹

El gen presenta una repetición en tándem de los nucleótidos citosina, adenina y guanina (CAG), codón se codifica para el aminoácido glutamina en el exón 1, al tener una variante el número de trinucleótidos repetidos, se vuelve inestable y se

expande a longitudes patológicas (40 o más repeticiones).¹⁰

Existen 2 tipos de EH que difieren en la longitud de las expansiones (Figura 3):

- I. Expansiones moderadas dentro de la región codificante o exones de un gen.
- II. Expansiones muy largas en los intrones de un gen.

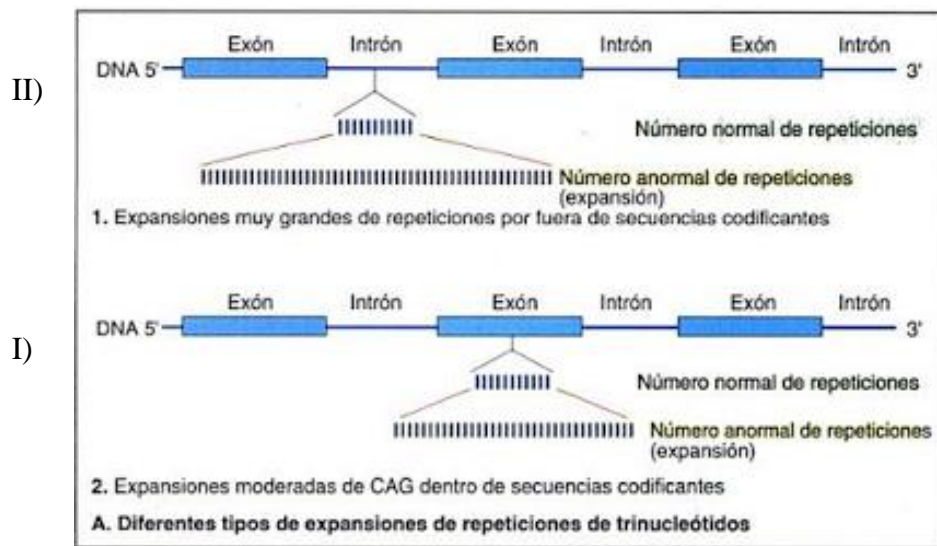


Figura 3: Expansiones moderadas de CAG en exones y expansiones extensas intrónicas de secuencias repetidas, comparadas con el número normal de repeticiones. I) Expansiones moderadas de CAG dentro de secuencias codificantes, II) Expansiones muy grandes de repeticiones por fuera de secuencias codificantes.¹¹

Las enfermedades de tipo I se caracterizan por la expansión del trinucleótidos CAG dentro de la región codificante (exón), como es el caso de la Huntingtina. El triplete CAG codifica para el aminoácido glutamina, por lo que el nombre de estas enfermedades se les conoce como trastornos por poliglutaminas o poliQ (Figura 2).¹²

Las enfermedades de tipo II se caracterizan por la expansión de trinucleótidos CTG, GAA, GCC o CGG dentro de una región no codificante del gen involucrado, ya sea

en el extremo 5" (GCC en el síndrome del X frágil tipo A, FRAXA), en el extremo 3' (CGG en FRAXE; CTG en la distrofia miotónica), o en un intrón (GAA en la ataxia de Friedreich) (Figura 3).¹²

La Tabla 1 muestra las enfermedades producidas por expansión de trinucleótidos.¹²

	Locus	Gen	Producto	Alelos			Secuencia
				Normales	Intermedios	Mutados	
Por expansión en regiones no codificadoras							
FRAXA	Xq27.3	<i>FMR1</i>	FMRP-1	6-50	50-200	>200	CGG
FRAXE	Xq28	<i>FMR2</i>	FMRP-2	6-35	61-200	>200	GCC
FRA11B (Jacobsen)	11q23.3	<i>CBL2</i>		11-20		>100	CGG
FRA16A	16p11			16-49		100-1.900	CCG
Ataxia de Friedreich	9q13-21.1	<i>X25</i>	Frataxina	7-34	35-80	100->1.700	GAA
Distrofia miotónica	19 q13	<i>DM</i>	Proteincinasa	5-35		50-> 200	CTG
Ataxia espinocerebelosa 8	13q21	<i>SCA8</i>		15-50	50-70	80-> 800	CTG
Ataxia espinocerebelosa 12	5q31-32	<i>SCA12</i>	PPP2r2B	31-45		55-78	CAG
Por expansión en regiones codificadoras (exónicas)							
Enfermedad de Huntington	4p16.3	<i>HD</i>	Huntingtina	6-35	30-38	38-180	CAG
Atrofia muscular bulboespinal (Kennedy)	Xq11-12	<i>AR</i>	Receptor de andrógenos	9-36		38-65	CAG
Ataxia espinocerebelosa 1	6p	<i>SCA1</i>	Ataxina-1	6-39		40-88	CAG
Ataxia espinocerebelosa 2	12q	<i>SCA2</i>	Ataxina-2	14-32		33-77	CAG
Ataxia espinocerebelosa 3 (Machado-Joseph)	14q	<i>SCA3</i>	Ataxina-3	12-40		55-86	CAG
Ataxia espinocerebelosa 6	19p13		Proteína canal de calcio	4-18		21-33	CAG
Ataxia espinocerebelosa 7	3p12-13	<i>SCA7</i>	Ataxina-7	7-17		34->200	CAG
Atrofia dentatorrubropalidolusiana (Haw-River)	12p12	<i>DRP</i>	Atropina-1	3-35	35-48	49-93	CAG
Ataxia-esquizofrenia				12-28		>1.200	CAG

Tabla 1: Enfermedades producidas por expansión de trinucleótidos repetidos de tipo I y tipo II.¹¹

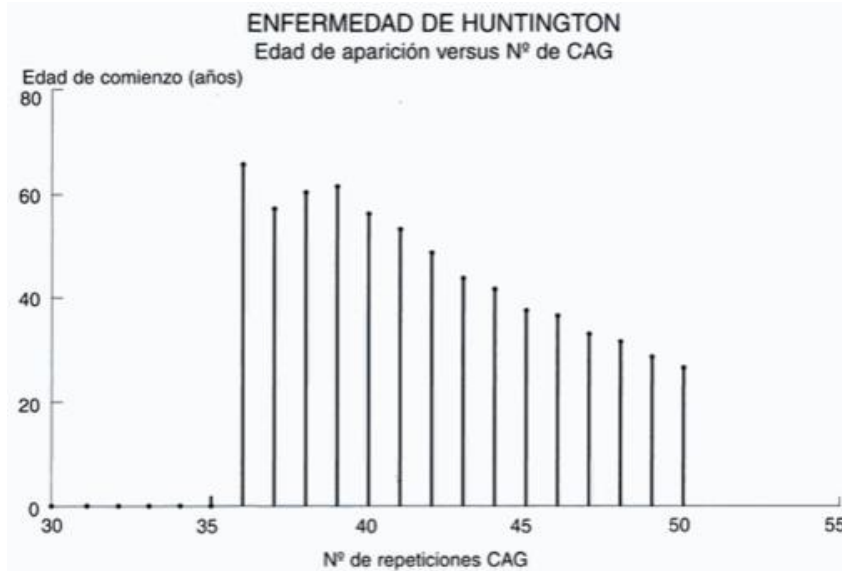


Figura 4: Relación entre el número de tripletes CAG en los pacientes con enfermedad de Huntington y la edad de inicio de los síntomas.⁶

La Figura 4 muestra la relación entre el número de repeticiones CAG en los pacientes con EH y la edad de inicio de los síntomas. Existe un intervalo entre 27 y 39 repeticiones conocido como la zona gris en ésta hay 2 posibilidades:

- a) Número de repetidos de 27 a 35 (alelo intermedio): Las personas con este número de repetidos son causa de mutaciones de novo en la descendencia.⁷
- b) Número de repetidos de 36 a 39 (penetrancia incompleta): Algunas personas con este número de repetidos pueden desarrollar los síntomas de la enfermedad, a edades muy adultas o morir sin desarrollar nunca los síntomas. Los hijos de una persona con penetrancia incompleta tienen una posibilidad de heredar el gen de penetrancia incompleta o completa del 50% (Tabla 2).¹³

Número de repeticiones CAG		
Número de repeticiones	Resultado	Estado
10 - 26	Normal	No afectado
27 - 35	Intermedio	
36 - 39	Penetrancia incompleta	Afectado
40 o más	Penetrancia completa	

Tabla 2: Estimaciones preliminares recientes de la relación entre las copias CAG y el resultado probable de EH

Por otro lado, un gran número de repeticiones CAG se asocian a temprana aparición de la enfermedad, denominado fenómeno de anticipación génica, lo que da origen a la enfermedad de Huntington juvenil (antes de los 20 años de edad) y la enfermedad de Huntington infantil. Existe una variabilidad importante en el número de repeticiones CAG, pero los pacientes menores de 10 años (EH infantil) suelen tener más de 80 repeticiones, aunque este número puede ser mayor al haberse reportado repetidos de hasta 250 (Figura 3).¹⁴

El fenómeno de anticipación génica se refiere al aumento del número de tripletes en la secuencia afectada por las divisiones celulares, especialmente en la gametogénesis (formación de gametos por medio de la meiosis). Por lo que con el paso de las generaciones el número va aumentando, lo que provoca mayor gravedad de la enfermedad y la aparición a más temprana edad.¹⁵

Aunque es importante tener en cuenta que no puede predecirse la edad en la que aparecerán los primeros síntomas, se ha identificado que la variabilidad del inicio de la enfermedad se puede deber también a genes modificadores, y a factores ambientales. Si se llegaran a identificar a los modificadores independientes de la mutación, ya sean genes o factores ambientales, se podría encontrar un tratamiento para retardar el inicio de la enfermedad.⁶

3.1.5 Epidemiología.

La enfermedad de Huntington afecta a todas las poblaciones con una incidencia de 5 a 10 en 100,000 habitantes en los países occidentales, siendo mucho más baja en individuos de poblaciones negras, orientales y finlandeses, y a nivel mundial distribuida en igual proporción entre hombres y mujeres (Figura 5).¹⁶

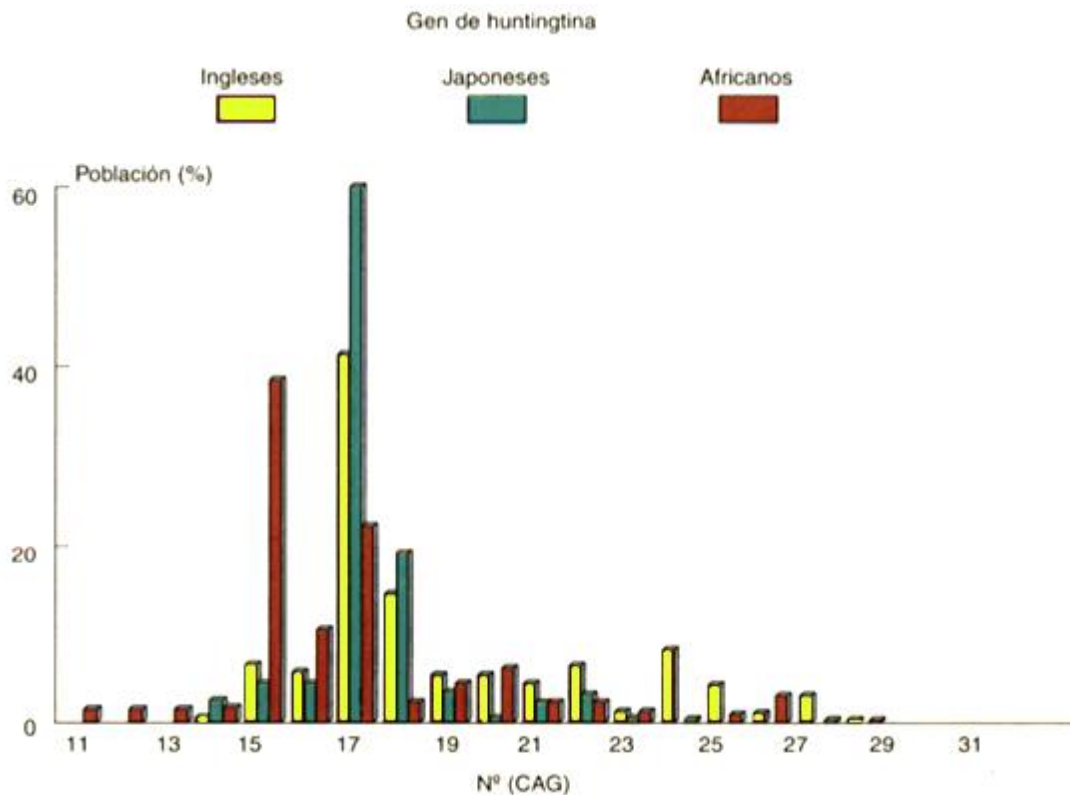


Figura 5: Distribución de los números de tripletes repetidos (CAG) en la población inglesa comparada con la japonesa y la africana del sur (Tomada y modificada).⁶

Existe evidencia de que cuando el gen mutado se hereda del padre, es más grave que de la madre, ya que aumenta el número de repeticiones. El motivo de esto podría encontrarse en el proceso de producción de los espermatozoides, ya que, a diferencia del óvulo, el esperma se produce por millones diariamente, esto implica

que el DNA también se copie millones de veces durante este proceso, por lo que existe una mayor posibilidad de que se produzcan errores genéticos.⁹

Los progenitores de mayor edad tienen más probabilidades que los progenitores más jóvenes de pasar una copia expandida, esto de nuevo es provocado porque a lo largo de la vida, un hombre crea nuevos espermatozoides, lo que permite que ocurran más errores al copiar el DNA según va envejeciendo el hombre.⁹

Es importante decir que el número de repeticiones CAG determina la gravedad de los síntomas; la edad en la que se presentarán los síntomas y la progresión de la enfermedad. La edad promedio en la que se presentan los primeros síntomas es entre 30 a 50 años en un rango de entre 2 y 85 años. El tiempo de progresión entre el diagnóstico y la muerte es de 15 a 20 años y la causa más común de muerte es la neumonía, seguido del suicidio.¹⁷

3.1.6. Síntomas.

La enfermedad de Huntington en general provoca trastornos motrices, cognitivos y psiquiátricos con un amplio espectro de signos y síntomas, estos últimos se manifiestan al inicio y varían en cada paciente durante el curso de la enfermedad, algunos síntomas son más predominantes.^{18cdsfgv v}

3.1.6.1 Trastornos del movimiento.

Las alteraciones motoras relacionadas con esta enfermedad comprenden movimientos involuntarios y deterioro en los movimientos voluntarios:

- Movimientos espasmódicos o de contorsión involuntarios (corea).
- Problemas musculares, como rigidez o contracturas musculares (distonía).
- Movimientos oculares lentos o anormales.
- Marcha, postura y equilibrio afectados.
- Incapacidad o dificultad de comunicarse por medio del habla, la escritura o la mímica (afasia).
- Dificultad o imposibilidad para tragar (disfagia).

El deterioro en los movimientos voluntarios, tiene un mayor impacto en las actividades de la vida diaria del paciente, como son trabajar, comunicarse y ser independiente.¹⁸

3.1.6.2 Trastornos cognitivos.

Entre los signos del deterioro cognitivo asociados a la enfermedad de Huntington se encuentran:

- Dificultad para organizarse, establecer prioridades o enfocarse en tareas.
- Incapacidad de reconocer la información que llega a través de los sentidos, especialmente la vista (agnosia).
- Falta de flexibilidad o tendencia a quedarse sumido en el pensamiento, conducta o acción.
- Falta de control de los impulsos, que pueden tener como consecuencia arrebatos, actuar sin pensar y promiscuidad sexual.
- Pérdida de la capacidad de llevar a cabo tareas antes aprendidas (apraxia).
- Falta de conciencia sobre las conductas y habilidades propias.

- Lentitud para procesar pensamientos o encontrar las palabras.
- Dificultad para aprender nueva información.

3.1.6.3 Trastornos psiquiátricos.

- Sensación de irritabilidad, tristeza o apatía
- Retraimiento social.
- Insomnio.
- Fatiga.
- Ideas frecuentes sobre muerte, el morir o el suicidio.
- Trastorno obsesivo compulsivo.- pensamientos recurrentes e invasivos, y conductas repetitivas.
- Manías.- hiperactividad, conductas impulsivas, autoestima excesiva.
- Trastorno bipolar.- episodios alternos de depresión.

Además de los síntomas ya mencionados, la pérdida de peso es muy común en los pacientes con la EH, especialmente, mientras avanza la enfermedad.¹⁸

En la EH se reconocen tres fases de avance que se caracterizan por las siguientes series de síntomas:

1.- Fase inicial.

Durante los primeros años de vida es posible que la enfermedad pase desapercibida, ya que los signos temprano de la EH pueden ser sutiles, implicando deterioros poco notables en la velocidad del movimiento, cognición, coordinación y marcha, así como la aparición de movimientos coreicos y rigidez. Dentro de las alteraciones emocionales se produce irritabilidad, inestabilidad y disminución del

estado de ánimo.¹⁹

2.- Fase intermedia.

En esta fase la enfermedad es más visible, particularmente el corea resulta problemático, ya que se presentan dificultades para hablar, caminar o manejar objetos. Respecto a las relaciones sociales, se presenta un gran deterioro debido a la desinhibición conductual, lo que provoca agresividad o hipersexualidad, posteriormente, el deseo sexual disminuye.

Otro síntoma típico de esta fase es la disminución del placer (anhedonia) y las alteraciones para conciliar o mantener el sueño.¹⁹

3.- Fase avanzada.

Se caracteriza por la incapacidad para hablar y para ejecutar movimientos voluntarios, en la mayoría de los casos los pacientes conservan la conciencia del entorno, aunque algunos presentan dificultades para orinar o defecar.

Los movimientos coreicos se agravan, se presentan dificultades para tragar, lo que provoca las infecciones como neumonía y otras enfermedades relacionadas. En esta fase, se llevan a cabo muchos suicidios.¹⁹

3.1.7 Diagnóstico.

El diagnóstico lo realiza un equipo multidisciplinario en el que se incluye a un neurólogo especialista en movimientos anormales con base en la historia clínica del paciente y sus antecedentes familiares; también es importante la consulta con un especialista en Genética.⁹

El descubrimiento del gen *HTT* permitió realizar la prueba molecular para hacer confirmar el diagnóstico de la enfermedad, misma que debe hacerse con base en los datos clínicos, incluidos los antecedentes familiares.²⁰

Hay ocasiones en las que al hacerle las pruebas moleculares a un paciente con probable enfermedad de Huntington, los resultados moleculares son negativos, lo que nos lleva a la sospecha de una enfermedad similar a Huntington (del inglés *Huntington-like*) o fenocopia, ésta debe ser considerada como un diagnóstico diferencial.²¹

3.1.8 Imagenología.

La resonancia magnética (RM) es una técnica no invasiva en el diagnóstico de la enfermedad de Huntington, ya que proporciona imágenes de las estructuras cerebrales, donde se puede observar una disminución del tamaño de algunas partes del cerebro, particularmente de los núcleos caudados y el putamen, así como el agrandamiento de cavidades llenas de líquido dentro del cerebro llamadas ventrículos (Figura 6).²²

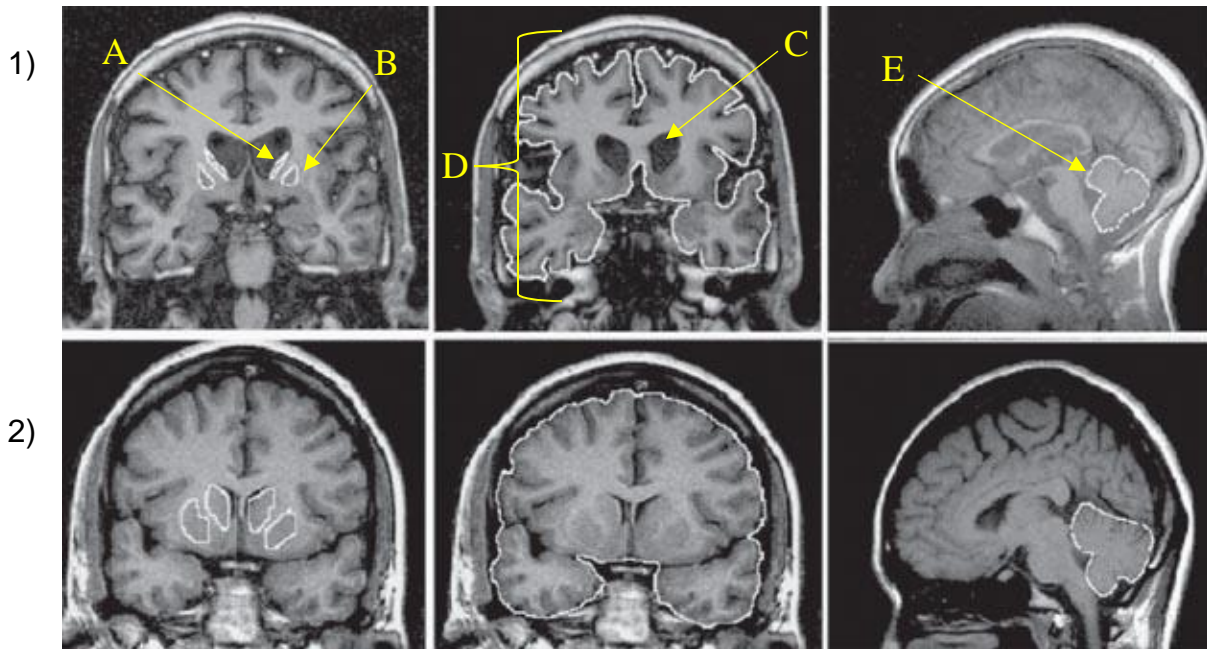


Figura 6: Imagen coronal FSPGR (siglas del inglés fast spoiled gradient echo) del cerebro de un paciente con Huntington (1) comparada con un control sano (2). Donde se observa la disminución del tamaño de los núcleos caudados (A) y el putamen (B), el agrandamiento de los ventrículos (C), además de ser evidente la atrofia cortical generalizada (D) y la atrofia cerebelosa (E) (tomada y modificada).²³

3.1.9 Prevención.

No existen medidas que permitan prevenir la enfermedad de Huntington si ya se tiene la mutación en el gen *HTT*; es importante la asesoría genética, en especial si es el deseo de los pacientes en tener hijos para que conozcan los riesgos y tomar decisiones al respecto, hacerles conciencia que existen otros procedimientos como la fecundación *in vitro* y el diagnóstico genético preimplantacional, o la adopción.¹⁸

3.1.10 Tratamiento.

No existe cura para la enfermedad de Huntington y no hay forma conocida de detener su progresión. El objetivo del tratamiento es reducir el curso de la

enfermedad y ayudar a las personas a valerse por sí mismas, por el mayor tiempo y en la forma más cómoda posible.⁶

Los medicamentos varían de acuerdo con los síntomas. Los bloqueadores de dopamina pueden ayudar a reducir los comportamientos y movimientos anormales.⁶

Entre los medicamentos para tratar los trastornos del movimiento comprenden los siguientes:

- Tetrabenazina.- Reduce los movimientos espasmódicos y de contorsión involuntarios, pero puede empeorar la depresión u otros trastornos psiquiátricos.
- Antipsicóticos (haloperidol, clorpromazina).- Reducen los movimientos involuntarios, pero puede empeorar las contracciones involuntarias y la rigidez muscular.
- Levetiracetam.- Reduce la corea, entre los efectos secundarios comprenden, náuseas, malestar estomacal y cambios de humor.
- Clonazepam.- Disminuye el movimiento, pero puede provocar somnolencia y un alto riesgo de dependencia y abuso.

Entre los medicamentos para tratar los trastornos psiquiátricos se encuentran:

- Antidepresivos (Citalopram, escitalopram, fluoxetina y setralina).- Pueden tener algún efecto en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo. Entre los efectos adversos se comprenden náuseas, diarrea, somnolencia y presión arterial baja.
- Antipsicóticos (Quetiapina, Risperidona y Olanzapina).- Inhiben los estallidos de violencia, la agitación y otros síntomas de los trastornos del estado de ánimo o la psicosis, sin embargo, pueden provocar trastornos del movimiento.

- Estabilizadores del ánimo (Valproato, Carbamazepina y la Lamotrigina).- Evitan los altibajos emocionales asociados al trastorno bipolar.
- No existe tratamiento eficaz para la demencia, éste es el aspecto más invalidante de la enfermedad.

A medida que la enfermedad progrese, los pacientes necesitarán asistencia y supervisión; con el paso del tiempo es posible que requieran atención durante las 24 horas.⁶

3.1.11 Fenocopias de la Enfermedad de Huntington.

Una fenocopia es un síndrome fenotípicamente característico de un genotipo determinado, pero producido por otras causas genéticas. En el caso de la EH se considera fenocopia a un síndrome que presenta similitudes fenotípicas, pero producido por cualquier otra causa diferente a la mutación genética en el gen HTT, ya sea genética o no. Aunque no hay una definición establecida de fenocopia de la EH, en una revisión reciente Wild EJ y cols²⁴, definieron fenocopia de la EH como un síndrome que debe cumplir 3 criterios:

- 1.- Trastorno del movimiento compatible con EH.
- 2.- Estudio genético negativo para la EH.
- 3.- Al menos uno de estos tres puntos:

- Patrón familiar autosómico dominante (AD)
- Deterioro cognitivo
- Síntomas psiquiátricos.²⁵

Otro aspecto importante de las fenocopias es que muestran una heterogeneidad genética de locus. Se han determinado cuatro cuadros clásicos de fenocopias de

EH, de las cuales 3 tienen un origen genético específico con herencia autosómica dominante, y sólo uno muestra un patrón de herencia autosómica recesivo (AR) y no ha sido posible dilucidar su causa. A estos trastornos se les ha denominado enfermedades *Huntington-like* (del inglés *Huntington Diseases Like* HDL) de tipo 1, 2, 3 y 4: (Tablas 3 y 4).¹²

- HDL1: Es una presentación poco frecuente de la enfermedad priónica familiar autosómica dominante, reportada por primera vez en 2001. Es causada por inserción o delección en la región del octapéptido repetido (Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln) en el gen de la proteína priónica (*PrP*). La edad media de inicio es en la edad adulta temprana entre 20 y 45 años. El tiempo medio de supervivencia es de 1 a 10 años, y la progresión rápida es sospechosa de esta causa. La enfermedad priónica familiar puede producir una amplia gama de fenotipos, puede parecerse a la EH con cambios prominentes de personalidad, síntomas psiquiátricos y deterioro cognitivo, corea, rigidez y disartria. Puede haber ataxia de la extremidad y tronco y convulsiones. La enfermedad priónica también puede presentarse con síntomas conductuales o psiquiátricos, deterioro cognitivo, trastornos visuales, signos cerebelosos y rigidez; además de otros signos neurológicos, que evolucionan hacia el mutismo y la inmovilidad.^{25, 26}
- HDL2: Causada por variantes en juntofilina-3 (*JPH3*), representa aproximadamente el 0.4% de las fenocopias de la EH en los países occidentales; sin embargo, es frecuente en sudafricanos de ascendencia subsahariana. La forma clásica de HDL2 se presenta con características cognitivas, psiquiátricas y motoras similares. Sin embargo, el parkinsonismo puede ser más prominente en HDL2 en comparación con EH. También se han informado casos de inicio temprano con síndrome acinético-rígido progresivo, pero corea clínicamente insignificante. A diferencia de la EH de inicio juvenil en HDL2 de inicio temprano, hay una ausencia de convulsiones y en su mayoría movimientos oculares normales. La enfermedad conduce a

la muerte dentro de los 10 a 20 años de la aparición de los primeros síntomas. Este síndrome se debe a expansiones repetidas de tripletes de CTG-CAG altamente penetrantes en el gen *JPH3*, en el cromosoma 16q24.3. Los alelos normales varían de seis a 28 tripletes, mientras que las expansiones de repeticiones patológicas varían de 40 a 58 tripletes. La proteína codificada participa en la estabilización de los complejos de membrana de unión y la regulación del flujo de calcio neuronal. La expresión anormal de la proteína *JPH3* aumenta la vulnerabilidad celular. Se ha sugerido un efecto tóxico adicional causado tanto por una pérdida tóxica de la expresión de *JPH3*, como por una ganancia tóxica de la función del ARN de *JPH3*.^{25, 26}

- HDL3: Trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo descrito en una familia de Arabia Saudita. Tiene un inicio temprano y el patrón recesivo de la herencia, lo que la se diferencia claramente de los otros síndromes HDL. El fenotipo clínico es complejo, con deterioro mental de inicio en la infancia, alteración del habla, distonía, corea y otras características extrapiramidales y piramidales. La resonancia magnética muestra una atrofia progresiva de los núcleos caudados bilateralmente y la corteza frontal. El gen causante aún no está claro, pero el locus de la enfermedad se asignó inicialmente al cromosoma 4p15.3 (Tabla 3).^{25, 26}
- HDL4: Al igual que HDL2, consiste de una expansión de una secuencia repetitiva de CAG del gen de la proteína de unión a caja TATA (TBP), ubicado en el cromosoma 6q27, que causa la enfermedad de Huntington tipo 4, que corresponde a la ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17). La herencia es autosómica dominante. El tamaño normal de los alelos varía de 25 a 40 repeticiones de CAG / CAA, mientras que de 41 a 48 repeticiones de CAG / CAA reducen la penetrancia y las repeticiones de 49 y mayores llevan a la penetrancia completa. Sin embargo, ha sido difícil determinar el corte exacto del número de repeticiones normal versus patogénico. La proteína codificada, TBP, funciona como factor de iniciación de la transcripción. La

TBP expandida con trectos de poliglutamina reduce sus propias capacidades intrínsecas de unión al ADN y de transcripción. El fenotipo clínico de HDL4 / SCA17 es marcadamente heterogéneo y la edad de inicio varía entre los 3 y los 75 años.^{25, 26}

Éstos trastornos HDL en general aparecen a principios o a mediados de la edad adulta, aunque los primeros síntomas pueden presentarse en la primera década de vida del paciente, entre esos síntomas que en general se presentan son: problemas emocionales, irritabilidad, mala coordinación, dificultades para caminar, hablar y tragar, movimientos involuntarios, entre otros, mismos que se desarrollan en la Enfermedad de Huntington.²⁷

Enfermedad	Cromosoma	Gen	Proteína	Edad inicio (años)	Características clínicas/paraclínicas	Distribución geográfica
HDL3 (AR)	4p15.3	No conocido	No conocida	3-4	Corea, parkinsonismo, distonía, retraso psicomotor, demencia, piramidalismo, ataxia y otras Δ marcha	Arabia Saudí (2 familias)
Corea-acantocitosis (AR)	9q21	VPS13A	Coreína	20-30	Distonía oromandibular y mutilaciones Corea, tics, parkinsonismo, demencia Acantocitos, \uparrow CCK, \uparrow PH, Δ RM	
Síndrome de McLeod (ligado a X)	Xp21	XK	Ag Kell eritrocito	40-60	Corea, parkinsonismo, distonía, s. psiquiátricos, demencia, epilepsia, NP, miopatía, cardiopatía, anemia	
PKAN (AR)	20p13	PANK2	PANK2	Infancia	Distonía oromandibular, parkinsonismo, espasticidad, demencia, corea 10% acantocitos; RM: "ojo de tigre"	
Enfermedad de Wilson (AR)	13q14.3	ATP7B	ATP7B	20-30	Distonía, parkinsonismo, demencia, s. psiquiátricos, raro corea, hepatopatía Anillo Kayser-Fleischer, \downarrow ceruloplasmina \downarrow cupremia, \uparrow cupruria; Δ RM, biopsia h.	
Ataxia de Friedreich (AR)	p9	X25	Frataxina	<20	Ataxia cerebelosa, nistagmo, arreflexia, escoliosis, pie cavo, cardiopatía, DM	

Tabla 3: Enfermedades autosómicas recesivas (HDL3) y ligadas al cromosoma X causantes de corea.²⁵

Enfermedad	Cromosoma	Gen	Proteína	Edad inicio (años)	Características clínicas/PC	Distribución geográfica
EH	4p15	IT15/HD/Huntingtin	Huntingtina	<30	Corea, parkinsonismo, distonía, demencia, síntomas psiquiátricos	
HDL1	20p12	PRNP	PrP	20-40	Fenotipo EH + prionopatía (demencia, piramidalismo, mioclonías, síntomas psiquiátricos)	Suecia
HDL2	16q24.3	JPH3	Junctofilina-3	25-45	Fenotipo EH, distonía sin corea Algunas formas fenotipo Westphal 10% acantocitos	Raza negra de África del Sur
HDL4 (SCA-17)	6q27	TBP	TATA-box binding proteína	25-40	Ataxia, 20% corea, demencia, epilepsia, piramidalismo, Δ PESS, Δ PET/SPECT RM: atrofia cerebelo y ribeteado palidal	Alemania Japón
SCA1	6p23	ATXN1	Ataxina 1	30-40	ADCA-I, PNP, atrofia cerebelo (RM)	
SCA2	12q24	ATXN2	Ataxina 2	30-40	ADCA-I, PNP, atrofia cerebelo (RM)	
SCA3 (Machado-Joseph)	14q32.1	ATXN3	Ataxina 3	20-50	ADCA-I, PNP, atrofia cerebelo (RM)	
SCA7	3p	ATXN7	Ataxina 7	20-50	ADCA-II, atrofia cerebelo (RM)	
ADRPL	12p13.31	Atrophin 1	Atrofina 1	<20 >40	Epilepsia mioclónica progresiva Ataxia, corea, demencia Atrofia cerebelo y tronco (RM)	Japón
Neuroferritinopatía	19q13	FTL	Polipéptido ligando del Fe	40	Asimetría, distonía oromandibular, corea, parkinsonismo, demencia, ataxia Ferritina sérica baja, Δ RM, biopsia m.	Gran Bretaña
Corea hereditaria benigna	14q13	TIF-1 (y otros)	Factor de transcripción tiroideo 1	Infancia	Corea no progresiva Δ pulmonares y tiroides	

Tabla 4: Enfermedades autosómicas dominantes causantes de corea.²⁵

3.1.11.1 Heterogeneidad genética.

Término utilizado para indicar una serie de fenotipos similares que pueden estar determinados por genotipos diferentes, es importante reconocer la heterogeneidad genética, ya que es un aspecto primordial en el diagnóstico clínico. Existen dos tipos de heterogeneidad genética:

- Heterogeneidad alélica: Distintas mutaciones en un mismo gen pueden producir genotipos diferentes, pueden producir variaciones clínicas o incluso cuadros clínicos diferentes.
- Heterogeneidad de locus o no alélica: En este caso, las mutaciones de *loci* cromosómico diferentes pueden producir el mismo fenotipo o parecido.²⁷

Se han encontrado pacientes con síndromes clínicos típicos de la EH que portan alelos normales del gen *HTT*, además de que no portan ningún cambio en los *loci* antes descritos, por lo que existe aún más heterogeneidad genética para los fenotipos de la enfermedad de Huntington.⁴

3.1.11.2 Los genes asociados a las fenocopias de la EH son:

- ❖ *PRNP* (HDL1): Gen cuyo producto proteico es la proteína priónica (PrP), misma que es activa en el cerebro, al igual que en otros tejidos. Se desconoce la función precisa la PrP, aunque se cree que está involucrada en diferentes procesos, como son: el transporte de iones de cobre a las células desde el medio externo, protección en las neuronas de cualquier lesión y la formación de sinapsis, que son las conexiones entre las neuronas que permite la comunicación entre ellas.²⁸

Algunas mutaciones en el gen *PRNP* se dan por el cambio de un simple nucleótido por la inserción o deleción de nucleótidos, lo que provoca el cambio de aminoácidos en la proteína o la formación de codones de paro, lo que puede provocar una proteína no funcional. Debido a estas mutaciones se han identificado diferentes formas de la PrP. La versión normal se le conoce como PrP^C (proteína prion celular) para distinguirla de la proteína anormal, a la que se le conoce como PrP^{Sc} (proteína prion scrap).²⁸

- ❖ *JPH3* (HDL2): Gen que codifica para la proteína llamada juntofilina-3, que principalmente se expresa en el cerebro. A pesar de que la función de la proteína es poco clara, se considera que la proteína juega un papel importante en la formación de la estructura llamada “complejo de unión a membrana”, mismo que es un mediador entre los canales iónicos intracelulares y la superficie celular. Una región en el gen *JPH3* contiene

trinucleótidos repetidos CAG/CTG, que se repiten entre 6 a 28 veces y son la causa de HDL.²⁹

- ❖ *TBP* (HDL4): Gen del cual su producto es la proteína de unión a la caja TATA. La proteína de unión a la caja TATA esta activa en células de tejidos de todo el cuerpo, donde desempeña una función en la regulación de la actividad de muchos genes.³⁰

La caja TATA suele ser el sitio donde se une la ARN polimerasa, que es el sitio de inicio de la transcripción de muchos genes.³⁰

Una región del gen *TBP* contiene repeticiones de trinucleótidos CAG/CAA y normalmente el número de repetidos es de 25 a 42, pero un mayor número de repeticiones conduce a la producción de una proteína anormalmente larga de unión a la caja TATA, esta se acumula en las neuronas en el cerebro y altera las funciones normales y la eventual muerte de las neuronas en ciertas áreas del cerebro. Por otro lado, debido a que el gen *TBP* está activo en todos los tejidos el cuerpo, no está claro por qué los efectos de una mutación en este gen se limitan al cerebro.³⁰

Existen otras condiciones que pueden cursar con corea, dentro de éstas las SCAs, autosómica dominante, un grupo de entidades que de acuerdo al modo de herencia y a su expresividad variable deben considerarse en el diagnóstico diferencial de fenocopias de la EH.³⁰

- ❖ *ATXN1*: Gen que provee las instrucciones para la síntesis de la proteína ataxina-1, misma que se encuentra en el núcleo de las células de todo el cuerpo, pero se desconoce su función. Investigadores sospechan que esta proteína puede estar involucrada en varios aspectos de la regulación de la producción de proteínas, incluida la transcripción.³¹

Una región del gen *ATXN1* contiene un segmento de repetidos del trinucleótido CAG, normalmente éste se repite entre 4 a 39 veces; las personas con ataxia espinocerebelosa 1 (SCA1) tienen de 40 a más de 80 repeticiones, lo que conduce a la producción de la proteína ataxina-1,

anormalmente larga que se pliega de manera incorrecta en la forma tridimensional. Esta proteína anormal se agrupa con otras proteínas para formar agregados dentro del núcleo de las células, estos agregados evitan que la ataxina-1 funcione normalmente, lo que daña las células. Por razones que aún no están muy claras, los agregados de ataxina-1 solo se encuentran en el cerebro y la médula espinal. Hay células en el cerebro que parecen ser particularmente sensibles a la acumulación de estos agregados, que son las células de Purkinje ubicadas en la parte del cerebro que coordina el movimiento (cerebelo) y también están involucradas en la señalización química entre las neuronas.³¹

- ❖ *ATXN2*: Gen a partir del cual se sintetiza la proteína ataxina-2, ésta proteína se encuentra en el citoplasma e interactúa con el retículo endoplásmico de las células de todo el cuerpo.³²

El primer exón del gen *ATXN2* contiene segmentos de repetidos del trinucleótido CAG, normalmente se repite aproximadamente 22 veces; las personas con 32 o más repeticiones de CAG en el gen *ATXN2* desarrollan SCA2. No está claro como el segmento CAG anormalmente largo afecta la función de la proteína ataxina-2, pero se sabe que conduce a la muerte de células cerebrales, particularmente con las células de Purkinje, al igual que la ataxina-1.³²

- ❖ *ATXN3*: La ataxia espinocerebelosa tipo 3 es una enfermedad autosómica dominante causada por la expansión de un repetido CAG en el gen *ATXN3*, el cual codifica la proteína ataxina-3. La proteína ataxina-3 participa en el mecanismo llamado sistema de ubiquitina-proteasoma, el cual se encarga de la degradación de las proteínas dañadas.³³

La molécula ubiquitina se une a las proteínas innecesarias para su posterior degradación, la ataxina-3 se encarga de remover la ubiquitina justo antes de que las proteínas sean degradadas, de esta manera la ubiquitina puede

desarrollar su función más de una vez. Además de esta función, también tiene participación en la transcripción.³³

Los pacientes con SCA3 tienen más de 50 repeticiones del trinucleótido CAG, lo que provoca la producción de una versión anormalmente larga de la proteína ataxina-3, que se pliega incorrectamente en la forma tridimensional, lo que ocasiona que no pueda eliminar la ubiquitina de las proteínas que ya no son necesarias. Como resultado, las proteínas no deseadas, junto con la ubiquitina y la ataxina-3 forman agregados dentro del núcleo de las células. Sin embargo, no está claro cómo estos agregados afectan la función celular, ya que se encuentran en las células sanas y en las que mueren. Las neuronas y otros tipos de células cerebrales son las más afectadas por las mutaciones, primordialmente las células ubicadas en la parte que está conectada a la médula espinal y las células del cerebelo.³³

- ❖ *FXN*: Gen que codifica para la síntesis de la proteína frataxina, esta proteína se encuentra en las mitocondrias de las células en todo el cuerpo, los niveles más altos de la proteína se encuentran en el corazón, hígado, páncreas, médula espinal y músculos esqueléticos.³⁴

Una región del gen *FXN* contiene segmentos del trinucleótido repetido GAA, la mayoría de las personas presentan un número de repetidos menor a 12 (proteína corta normal); sin embargo, hay personas que presentan un número de repetidos aproximado entre 12 y 33 (proteína larga normal); las personas con un número de repetidos de 66 a más de 1,000 presentan la ataxia de Friedreich. La cantidad de repetidos de trinucleótidos está relacionada con la edad en que aparecen los síntomas de la ataxia de Friedreich, los pacientes con segmentos que se repiten menos de 300 veces tienden a presentar síntomas más tarde (después de los 25 años) que aquellas con repeticiones de trinucleótidos de GAA más grandes.³⁴

No se comprende completamente cómo las mutaciones del gen *FXN* causan la ataxia de Friedreich, lo que se sabe es que interrumpen la producción de frataxina, esta escasez provoca la disminución de la actividad de las

proteínas que contienen grupos de hierro-azufre, lo que podría afectar la producción de energía en las mitocondrias, además de que las células con cantidades insuficientes de frataxina son particularmente sensibles a los radicales libres.³⁴

- ❖ *C9orf72*: Gen de nombre “Marco de lectura abierta 72 del cromosoma 9”, provee instrucciones para la síntesis de la proteína C9orf72, se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, abunda en las células nerviosas, la corteza cerebral y en neuronas especializadas en el cerebro y la médula espinal que controlan el movimiento.³⁵

La proteína C9orf72 participa en varios procesos como la transcripción, la traducción y el transporte del RNA dentro de la célula.³⁵

El gen *C9orf72* contiene un segmento de repetidos de seis nucleótidos GGGGCC, este segmento se conoce como hexanucleótido repetido, este repetido es normal si se tiene menos de 30 repeticiones, al presentar más repetidos se presenta la enfermedad esclerosis lateral amiotrófica (ELA), afección caracterizada por la debilidad muscular progresiva, pérdida de masa muscular y movimientos involuntarios.³⁵

No está claro si la repetición del hexanucleótido reduce la función de la proteína C9orf72 o conduce a la producción de una proteína con una función anormal que interrumpe la producción de ARN y proteínas en la célula, lo que resulta en la formación de agregados, que se cree afectan en mayor medida a las neuronas motoras por su gran tamaño. Algunas personas con ELA también desarrollan demencia frontotemporal (DFT), que es un trastorno cerebral progresivo que afecta la personalidad, el comportamiento y el lenguaje. No está claro por qué algunas personas con mutaciones en el gen *C9orf72* desarrollan DFT y otras no.³⁵

- ❖ *PANK2*: Gen que codifica a la proteína pantotenato cinasa 2; esta enzima se encuentra activa en las mitocondrias, que son los centros de producción de energía de cada célula. Dentro de la mitocondria, la pantotenato cinasa 2 regula la formación de la molécula Coenzima A, esta molécula se encuentra en todas las células, incluyendo las neuronas, ya que es necesaria para la producción de energía por medio de los carbohidratos, lípidos y aminoácidos.³⁶

El gen *PANK2* es uno de los cuatro genes que sintetizan la proteína pantotenato cinasa; las funciones de las diferentes versiones de la proteína, probablemente varían dependiendo los tipos de tejidos y partes de la célula donde se encuentran.³⁶

3.2 ENFERMEDAD DE HALLERVORDEN-SPATZ

3.2.1 Historia de la Enfermedad de Hallervorden-Spatz.

La enfermedad de Hallervorden Spatz o como se llama actualmente neurodegeneración de la pantotenato cinasa (PKAN) o neurodegeneración por acumulación de hierro tipo 1, nombre que se le da por el acúmulo de hierro en las células nerviosas. Fue descrita por primera vez por el médico prusiano Julius Hallervorden y el médico Hugo Spatz.³⁷

Julius Hallervorden nació en el año 1882, en Landsberg Alemania, desarrolló interés por la neuropatología y las bases biológicas de las enfermedades mentales. En 1921 hizo una estancia en el Departamento de Neurohistología del Instituto Alemán de la Investigación para la psiquiatría de Munich (el actual Max Planck Gesellschaft), es aquí donde conoció al médico Hugo Spatz.³⁸

Ambos médicos se dedicaron a examinar cerebros de personas con enfermedades de índole neurológica, dentro de los cerebros analizados se encontraban los de dos

hermanas que presentaron un cuadro de neurodegeneración que no se había descrito antes, los médicos publicaron sus hallazgos sobre la nueva enfermedad en 1922 y 1924. En homenaje al descubrimiento de esta enfermedad se nombró con los apellidos de los investigadores, mismo que después sería cambiado por síndrome de pantotenato cinasa asociado a neurodegeneración, ésto debido a los métodos reprobables que se utilizaron.³⁷

Tras el Holocausto, tanto Hallervorden como Spatz siguieron trabajando en el área de neurociencia en el Instituto Max Planck, donde Julius recibió un doctorado honorario en el campo de la neuropatología en 1956, retirándose como profesor emérito antes de su muerte en 1966.³⁷

3.2.2 Gen *PANK2*

El gen de la *pantotenato cinasa 2* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 20 (20p13), tiene 34,761 pares de bases y 7 exones, este gen es el único cuyas mutaciones se han detectado en el síndrome de pantotenato cinasa asociado a neurodegeneración (*PKAN* por sus siglas en inglés). Clínicamente *PKAN* presenta las características de un desorden mitocondrial. Este gen codifica para la proteína pantotenato cinasa, su función principal como enzima reguladora es la biosíntesis de la coenzima A (CoA), misma que participa en varias vías metabólicas, como el ciclo del ácido cítrico, esterol y la biosíntesis de esteroides, biosíntesis de grupo hemo, síntesis de aminoácidos y la β -oxidación, además de que el gen *PANK2* regula la expresión del gen ferroportina.⁹

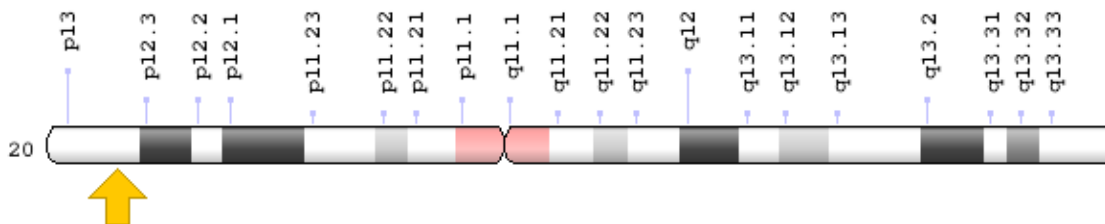


Figura 7: Localización cromosómica del gen PANK2, en el cromosoma 20, posición 13.³⁶

Se identificó al gen *PANK2* como el principal gen asociado a la Neurodegeneración por acumulación de hierro en el cerebro (*NBIA* por sus siglas en inglés), esta neurodegeneración corresponde a un grupo de trastornos genéticamente heterogéneos y progresivos. Se caracterizan por acumulación de hierro a nivel de los ganglios basales y otras regiones del cerebro, y se manifiestan con movimientos extrapiramidales como parkinsonismos y distonía.³⁹

Las causas de NBIA tiene varios orígenes. Alteraciones en la vía metabólica del hierro, desórdenes en el metabolismo de ceramidas/fosfolípidos, algunos desórdenes lisosomales en la regulación mitocondrial del hierro o desórdenes en la función de genes desconocidos.³⁹

Además del gen *PANK2*, también llamado neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro-1 (*NBIA1*), mismo que corresponde a los desórdenes en el metabolismo de ceramidas/fosfolípidos; se identificaron otros genes relacionados con la NBIA, así como la propuesta de posibles tratamientos. Algunos de los genes identificados se encuentran en la siguiente tabla: ³⁹

Gen identificado	Locación cromosómica	Comentarios
PANK1	Cromosoma 10q23	Se expresa preferentemente en corazón, hígado, y riñón
PANK2	Cromosoma 20p12.3-p1	La mutación del gen PANK2 induce un defecto en la sustitución de la proteína G411r
PANK3	Cromosoma 5q35	Se expresa abundantemente en el hígado
PANK4	Cromosoma 1p36	Se expresa en todos los tejidos, pero sobre todo en el músculo

Tabla 5: Genes relacionados con la NBIA, sus localizaciones en el genoma y donde se expresan en el organismo.²³

El gen *PANK2* no está implicado directamente con el metabolismo férrico, pero al estar mutado este gen, promueve la acumulación de hierro en el cerebro como efecto secundario y éste a su vez, se une a la cisteína libre, lo que promueve lesiones en proteínas, lípidos y DNA provocando la muerte neuronal.³⁹

3.2.2 Proteína pantotenato cinasa.

El gen *PANK2* codifica para la cinasa mitocondrial pantotenato cinasa, enzima reguladora de la síntesis de la CoA e indispensable para la síntesis de ácidos grasos, al igual que para el metabolismo energético. La alteración en la enzima causa el depósito de cisteína y hierro en los ganglios basales, hipocampo, sustancia nigra algunas regiones subcorticales y retina, el complejo hierro-cisteína puede provocar daño tisular, ya que el complejo promueve la aparición de estrés oxidativo.⁴⁰

La pantotenato cinasa es un precursor en la biosíntesis de la coenzima A desde la fosforilación citosólica del ácido pantotenato (vitamina B5), N-pantotenoilcisteína y panteteína (Figura 8). La CoA interviene en la biosíntesis y oxidación de ácidos grasos y descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, paso previo al ciclo de Krebs.²³

La disminución de la coenzima A, debido a las anomalías en la enzima pantotenato cinasa, conduce a defectos metabólicos como son la reducción de lípidos y biosíntesis de colesterol y defectos en la conjugación de los ácidos biliares. Estudios han demostrado tener concentraciones altas de lactato, lo que indica una deficiencia en la cadena respiratoria, además de que el déficit de la CoA provoca una acumulación de un producto tóxico que es la cisteína, ésta que al hierro (cofactor de la cisteína) y el complejo se acumula en zonas específicas en el cerebro, lo que provoca el estrés oxidativo.⁴⁰

3.2.4 Estrés oxidativo.

Es el proceso de deterioro celular dependiente de la producción de especies reactivas del oxígeno ROS (del inglés *reactive oxygen species*) y la capacidad natural del cuerpo para detoxificar o reparar los daños con rapidez de los productos intermedios residuales, éstos son generalmente átomos o moléculas pequeñas con alta capacidad reactiva, por lo que deben ser neutralizados lo antes posible para evitar daños en proteínas, lípidos y ADN. Sin embargo, los radicales libres también son moléculas señalizadoras que cumplen con funciones fisiológicas como la regulación del apetito en el hipotálamo, al igual que son utilizadas por el sistema inmunológico para atacar y matar patógenos y en la señalización celular (señalización redox).⁴¹

La mayor parte del oxígeno que respiramos se dirige a la mitocondria de cada célula donde se genera alrededor del 95% del ATP que consume la célula; en esta etapa el oxígeno se transforma en agua, aunque no en su totalidad, ya que algunas moléculas de oxígeno no se metabolizan de manera adecuada, reduciéndose parcialmente al anión superóxido ($O_2\cdot^-$). Esta ROS además de dañar macromoléculas de la mitocondria, puede transformarse en otras moléculas reactivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$), siendo éste probablemente el más tóxico de los radicales libres del oxígeno producido por

el cuerpo humano. Algunos de los radicales de oxígeno son muy selectivos en sus reacciones con moléculas biológicas, como por ejemplo el anión $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , mientras que el radical hidroxilo ($OH\cdot$) ataca a cualquier molécula que esté a su lado. Los daños provocados por las ROS son: la producción de protoxinas bioactivas, señales aberrantes, falla bioenergética, disfunción del proteasoma, agregación de proteínas, formación de inclusiones, sinaptólisis, apoptosis y necrosis.⁴¹

La formación de las ROS se debe a diferentes causas, entre ellas:

*Endógenas: Las que produce el propio organismo al llevar a cabo su funcionamiento: respiración mitocondrial, metabolismo de ácido araquidónico, acciones enzimáticas, entre otros.

*Exógenas: Son producidas por factores externos, como la contaminación ambiental, obesidad, estrés prologando, exposición a rayos UV, mala nutrición o a diversas enfermedades. Se ha demostrado que el estrés oxidativo es causa o consecuencia de más de 250 enfermedades.⁴²

3.2.5 Coenzima A.

Como su nombre lo indica es una molécula que ayuda a las enzimas a funcionar; está formada a partir de glucosa (misma que entra en la mitocondria indispensable para la síntesis de ácidos grasos), colesterol y la acetilcolina. La CoA consta de tres partes: un “cuerpo” compuesto por vitamina B5 (ácido pantoténico), una “cabeza” formada por el nucleótido adenosina difosfato (ADP) y una “cola” de β -mercaptoetilamina que es la parte más importante, ya que contiene el grupo

sulfhidrilo (SH-), que es donde se unen moléculas y otros grupos para formar ácidos grasos.⁴³

La CoA es una coenzima de transferencia de grupos acilo, que participa en diversas rutas metabólicas como son la síntesis y degradación de ácidos grasos, síntesis de la acetilcolina y de colesterol, formación de cuerpos cetónicos (sustratos energéticos) en condiciones especiales del metabolismo y del ciclo de Krebs; en este último, cada vez que se oxida una molécula de CoA se obtienen 12 moléculas de ATP, solo una se adquiere directamente y los otros once a través de la ATP sintasa.^{43,44}

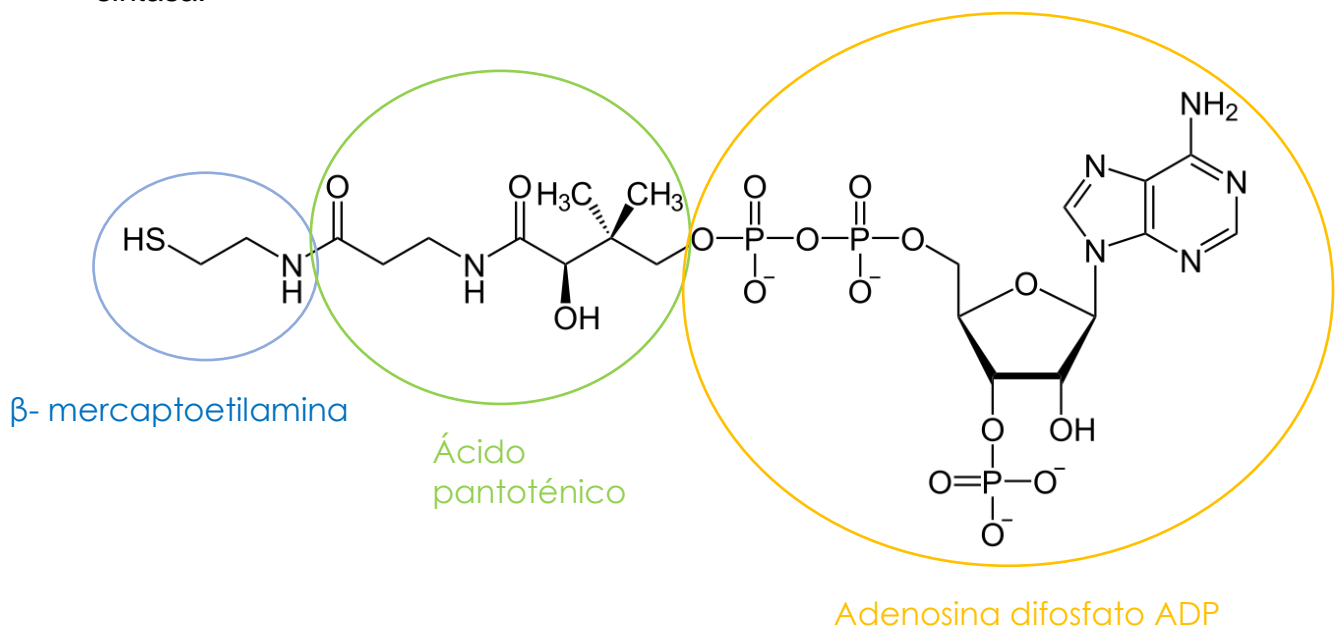


Figura 8: Estructura de la Coenzima A y las partes que la componen (Tomada y modificada).⁴⁵

La biosíntesis de la coenzima A consta de 5 etapas a partir del pantotenato (Figura 9):

1. El ácido panteotéico (vitamina B5) es fosforilada por la enzima pantotenato cinasa para generar la 4'- fosfopantotenato.

2. Una cisteína es añadida al 4'-fosfopantotenato mediante la enzima fosfopantotenoilcisteína sintetasa, para formar 4'-fosfo-N-pantotenoilcisteína (PPC).
3. La PPC se descarboxila a 4'-fosfo-panteteína mediante la fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa.
4. La 4'-fosfo-panteteína es adenililada para formar desfosfo-CoA mediante la enzima fosfopanteteína adenilil transferasa.
5. Por último, la defosfo-CoA es fosforilada a coenzima A utilizando ATP, mediante la enzima defosfo-CoA cinasa.²³

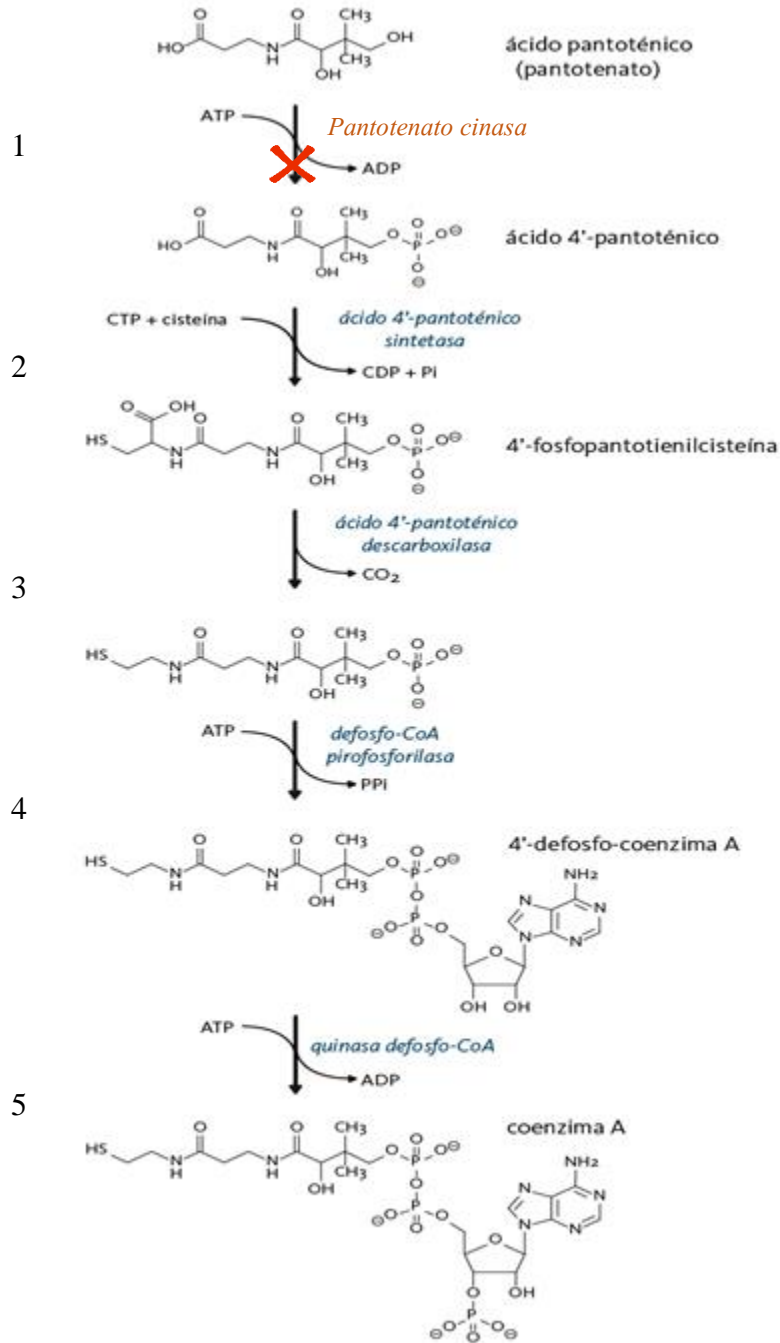


Figura 9: Etapas de la biosíntesis de la coenzima A, siendo interrumpida por un déficit en la enzima pantotenato cinasa.⁴⁶

El ácido pantoténico es un precursor en la síntesis de la Coenzima A. La reacción inicial de la fosforilación que convierte al ácido pantoténico a ácido 4'fosfopantoténico está dañada en individuos con variantes genéticas en el gen *PANK2*.⁴⁶

3.2.6 Cisteína.

La cisteína es un aminoácido no esencial, es decir, nuestro organismo es capaz de sintetizarlo por sí mismo, siempre que haya metionina suficiente. Es un aminoácido con azufre, conteniendo un grupo tiol (-SH), tiene un pH neutro, que al estar presente en un pH ligeramente básico se oxida, lo que propicia que dos cisteínas puedan unirse por enlace disulfuro formándose la cistina, misma que desempeña una función importante en la configuración de las proteínas que desempeñan un papel fundamental para la vida.⁴⁷

La cisteína forma parte del glutatión, que es el antioxidante más poderoso del cuerpo, es un tripéptido que se encuentra dentro de todas las células y es crucial para la eliminación de los radicales libres como las ROS, es decir, protege a las células y mitocondrias del daño oxidativo y peroxidación, está compuesto de tres aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina.⁴⁷

Entre las funciones que desempeña la cisteína dentro del organismo se encuentran:

- Posee acción antioxidante, por lo que retrasa el envejecimiento.
- Protege el sistema digestivo, a los glóbulos rojos, al corazón, al cerebro y al sistema linfático.
- Previene la oxidación del colesterol LDL, la artritis, cataratas, la diabetes y el cáncer.
- Favorece la eliminación de metales pesados.
- Optimiza el resultado atlético.⁴⁸

3.2.7 El hierro.

Metal esencial para el organismo, se encuentra en todas las células del cuerpo humano en baja concentración, el 70% del hierro se encuentra asociado a la hemoglobina, en el grupo hemo. Es importante mantener el hierro en los glóbulos rojos para poder llevar oxígeno a todo el cuerpo e incorporarlo por medio de la alimentación, ya sea en los alimentos de origen animal (hierro hemo), mismo que se absorbe fácilmente, y los de origen vegetal (hierro no hemo) mismo que se absorbe en cantidad muy baja.⁴⁹

El hierro cumple diversas funciones fisiológicas:

- En la sangre forma parte de la hemoglobina, que es la estructura en los glóbulos rojos que se encarga de transportar el oxígeno a todos los tejidos.
- En el sistema nervioso central está implicado en procesos vitales como el desarrollo neuronal, la producción de neurotransmisores, funciones relacionadas con el sistema de la dopamina, funciones cognitivas (aprendizaje y memoria), funciones motoras, mielinización, termorregulación, además de cumplir con un papel importante en la cadena respiratoria mitocondrial.
- Dentro de la célula, en la citocinesis (mitosis), en el transporte de electrones, en la actividad de enzimas antioxidantes, la expresión de genes, en la función de algunas proteínas, en la síntesis de lípidos, colesterol y en el sistema GABA.
- En la actividad endócrina e inmunitaria.
- Cofactor de muchas enzimas.⁵⁰

El hierro se acumula de manera natural en el sistema nervioso central (SNC) como parte del proceso de envejecimiento, una porción del metal sigue siendo activo en

procesos de oxidorreducción (redox) lo que ocasiona daño en el funcionamiento cerebral.

Como se ha mencionado anteriormente, tanto el hierro y la cisteína al no estar unidos, cumplen funciones fundamentales en el organismo por la formación del complejo, las altas o bajas concentraciones de los mismos o la edad, lo que provoca la toxicidad de ellos.⁵¹

3.2.8 Los ganglios basales.

También llamados núcleos basales, son grandes estructuras neuronales subcorticales ubicados en la base del cerebro que permiten conectar regiones inferiores con superiores.

Los ganglios basales (figura 9) están formados por diversos núcleos:

- Caudado.- Participa en el control movimiento voluntario y también está involucrado en procesos de aprendizaje y memoria.
- Putamen.- Involucrado en el desarrollo de sentimientos (amor y odio).
- Globo pálido.- Transmite información proyectada por los núcleos putamen y caudado hacía el tálamo.
- Lenticular.- Sus funciones incluyen las actividades desempeñadas por el globo pálido y el núcleo putamen.
- Núcleo Accumbens.- Sus actividades están relacionadas con los procesos emocionales y la elaboración de sentimientos (miedo, agresión, adicción, risa, experimentación de recompensa y efecto placebo).
- Cuerpo estriado.- Presenta interneuronas que expresan parvalbumina y catelcolaminas, somatostatina y dopamina.

- Cuerpo neostriado.- Sus funciones se definen a través de las actividades llevadas a cabo por el núcleo caudado y el putamen.
- Cuerpo amigdalino.- Realiza acciones vitales para el procesamiento y el almacenamiento de las reacciones emocionales (aprendizaje emocional), modula la memoria y permite el desarrollo de la cognición social.
- Sustancia negra.- La función de esta sustancia está relacionada con el aprendizaje, la orientación, el movimiento y la oculomoción.

Estas estructuras forman un circuito de núcleos que se encuentran interconectados entre sí, entre las principales funciones que realizan se encuentran el control motriz, emocional y cognitivo, ya que contienen neuronas motoras, sensitivas e internunciales.⁵²

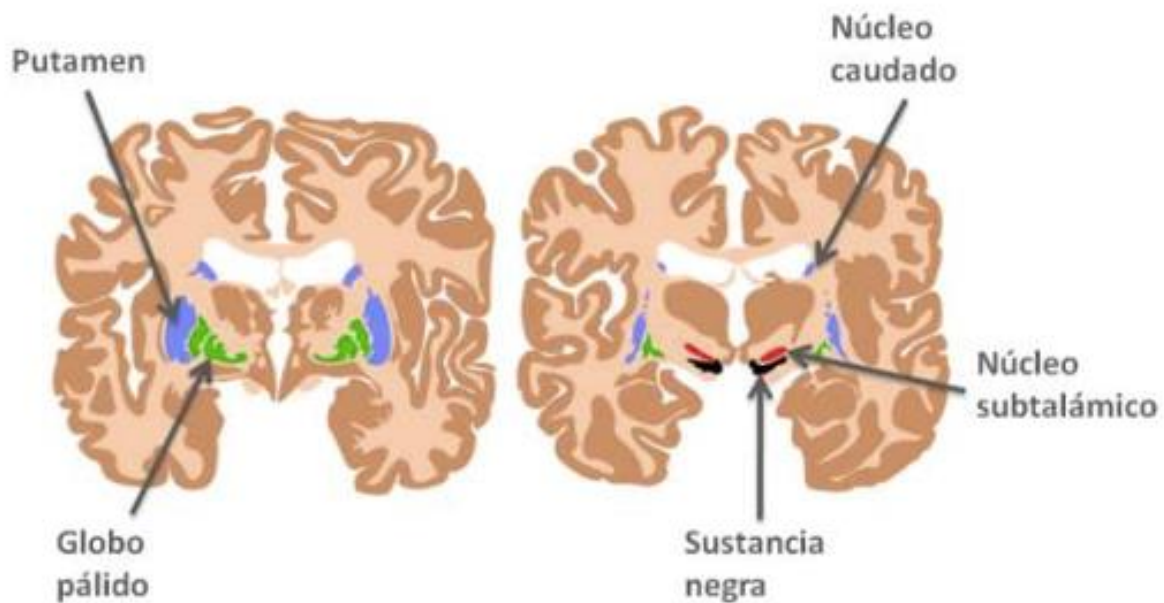


Figura 10: Ganglios basales y los núcleos que los componen.⁵³

3.2.9 Neurodegeneraciones con acumulación cerebral de hierro.

Grupo de trastornos neurológicos hereditarios en el que el hierro se acumula en el cerebro, principalmente en los ganglios basales. Entre los signos y síntomas de estas enfermedades incluyen contracciones musculares involuntarias con movimientos repetitivos y torsiones progresivas (distonía), rigidez en los músculos (espasticidad), parkinsonismo (dificultad para hablar, lentitud de movimientos, rigidez de los músculos y temblores), dificultad para coordinar movimientos (ataxia), anomalías neurológicas y psiquiátricas (confusión convulsiones y demencia); atrofia óptica o degeneración de la retina.⁵⁴

Este tipo de afecciones pueden empezar a cualquier edad, pero la progresión y severidad de la enfermedad varía. El deterioro cognitivo sólo ocurre en algunos subtipos y es poco frecuente, por otro lado, la atrofia cerebelosa se presenta en la mayoría de los 10 tipos identificados, cada uno está asociado a un gen específico.⁵⁴

3.2.10 Los genes asociados son:

- *PANK2*.- Gen que codifica a la enzima pantotenato cinasa, misma que está involucrada en la biosíntesis de la coenzima A. Se han identificado aproximadamente 100 variaciones en este gen, la más común reemplaza el aminoácido glicina con el aminoácido arginina en la posición 411 de la enzima (Gly411Arg). Las enfermedades provocadas por variaciones de este gen son Hallervorden Spatz o neurodegeneración asociada al pantotenato cinasa y la afección llamada Hipoprebetalipoproteinemia, acantocitosis, retinitis pigmentosa y degeneración pálida (HARP), ambas enfermedades implican problemas con el movimiento, la demencia y las anomalías de la visión.^{34,55}

- *PLA2G6*.- Gen que codifica la enzima fosfolipasa A2, encargada de metabolizar los fosfolípidos, lo que mantiene la integridad de la membrana. La enfermedad provocada por mutaciones en este gen es la Distrofia neuroaxonal infantil.^{56,57}
- *C19orf12*.- Codifica una enzima que lleva el nombre del gen, de la que se desconoce su función, pero se conoce su localización en la membrana de la mitocondria, por lo que se sospecha de su papel en el mantenimiento de lípidos. El nombre de la afección es la neurodegeneración asociada a la proteína de la membrana mitocondrial, misma que es considerada una enfermedad similar a la enfermedad Huntington.^{58,59}
- *FA2H*.- Gen que codifica la enzima 2-hidroxilasa de ácidos grasos, encargada de modificar los ácidos grasos utilizados para hacer grasas (lípidos); la 2-hidroxilasa agrega un átomo de oxígeno a un átomo de hidrógeno a un ácido graso para crear un ácido graso 2-hidroxilado, que son importantes en la formación de mielina normal. Se han identificado al menos nueve mutaciones en el *gen FA2H* en personas con neurodegeneración asociada a ácido graso hidroxilasa (FAHN). FAHN es un trastorno progresivo del sistema nervioso caracterizado por problemas de movimiento y visión que comienzan durante la infancia o la adolescencia y empeoran con la edad. Los escáneres cerebrales de las personas afectadas muestran acumulación anormal de hierro en el cerebro, en la región que está involucrada en el movimiento.^{60,61}
Las mutaciones que causan FAHN, reducen o eliminan la función de la enzima 2-hidroxilasa de ácido graso, que da como resultado una mielina anormal que es propensa al deterioro (desmielinización), lo que lleva a una pérdida de sustancia blanca (leucodistrofia).^{60,61}
- *ATP13A2*.- Gen que codifica una enzima de la subfamilia P5 de las ATPasas, que transporta cationes inorgánicas y otros sustratos. Las mutaciones en

este gen están asociadas con el síndrome Kufor-Rakeb, también llamado enfermedad de Parkinson 9.^{62,63}

- *WDR45*.- Gen que codifica la proteína repetida WD40, la cual interactúa con fosfoinosítidos 4 (WIPI4). La proteína WIPI4 es miembro de un grupo de proteínas que forman una estructura que asemeja una hélice de siete palas, además de estar involucrada en el proceso de autofagia, que ayuda a eliminar materiales innecesarios de las células, por medio de autofagosomas que son transportados a los lisosomas. Al presentar mutaciones en el gen *WDR45* se presenta la enfermedad neurodegenerativa asociada a la proteína beta-hélice.^{64,65}
- *COASY*.- Gen codificante de la coenzima A sintetasa, misma que se ve involucrada en los pasos 4 y 5 de la biosíntesis de la CoA. Las mutaciones en este gen provocan la neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro 6 (NBIA6).^{66,67}
- *FTL*.- Gen que provee instrucciones para hacer la cadena ligera de ferritina, que es parte de la proteína ferritina, misma que está formada de 24 subunidades. La ferritina almacena y libera hierro en las células, por lo que regula la cantidad de almacenamiento en las células y los tejidos. Si el gen presenta mutaciones se puede presentar el síndrome de hiperferritinemia-catarata o la neuroferritinopatía.^{68,69}
- *CP*.- Gen que codifica la proteína ceruloplasmina, la cual ayuda a mover el hierro de los órganos y tejidos del cuerpo a la sangre al incorporarlo en la molécula transferrina. Hay dos tipos de ceruloplasmina, una se sintetiza en el hígado y transporta el hierro a casi todo el cuerpo, menos al cerebro; la otra forma de ceruloplasmina se sintetiza en las células de la glía del sistema nervioso, mismas que protegen a las neuronas, ésta ceruloplasmina se

conoce como forma anclada de glicosilfosfatidilinositol (GPI). La enfermedad que resulta de la mutación de este gen es la Aceruloplasminemia.^{70,71}

- *DCAF17*.- Gen que codifica la proteína que lleva el nombre del gen (factor 17 asociado a DDB1 y CUL4) y de la que se desconoce su función, pero se sabe que es activa en diferentes tejidos (cerebro, piel e hígado) en el nucléolo de las células. El síndrome Woodhouse-Sakati es el resultado de las mutaciones en este gen.^{72,73}

Casi todas estas enfermedades se heredan de manera autosómica recesiva, excepto en el gen WDR45 que presenta una herencia autosómica dominante. No hay cura para ninguna de ellas y el tratamiento depende de los síntomas que se presentan como la distonía, en la que se incluyen los medicamentos: baclofeno, trihexifenidilo, toxina botulínica y estimulación cerebral. Otros de los síntomas comunes son los parkinsonianos, en los que se utilizan los medicamentos anticolinérgicos y la Levodopa.⁵⁴

3.2.11 Etiología de la enfermedad de Hallervorden Spatz.

La neurodegeneración asociada a la pantotenato cinasa es una enfermedad con patrón de herencia autosómica recesiva y es la causa más común de neurodegeneración por acumulación de hierro en el cerebro en los ganglios basales, ya que se presenta aproximadamente en el 50% de los casos de NBIA; sin embargo, la incidencia de la enfermedad es baja, además de que la manifestación de la afección puede ser esporádica o tener un carácter familiar, (solo entre el 15 y el 23% de los casos se asocian a consanguinidad).⁷⁴

Al ser una enfermedad autosómica recesiva, si los dos padres son portadores del

gen, la posibilidad de tener un hijo afectado con la enfermedad es de 25% en cada embarazo y de que el hijo sea portador en un 50%. Cuando los padres son parientes cercanos (consanguíneos), la probabilidad de tener alelos en común aumenta en comparación con los que no son parientes.⁷⁵

En un 3-5% de los pacientes en los que no se evidencia alguna alteración genética en el análisis por secuenciación del gen y que se puede deber a deleciones parciales o totales, se sospecha clínicamente de la enfermedad, aunque no se encuentran mutaciones en la secuenciación o sólo se identifica una mutación heterocigota, por lo que se debe considerar realizar el análisis de deleciones o duplicaciones.²³

3.2.12 Formas clínicas de presentación:

- 1) Clínica típica.- (75% de los casos), las características clínicas son homogéneas, severas, progresivas y deteriorantes. Los signos y síntomas de inicio temprano son piramidales y extrapiramidales acompañados de distonía, disartria y rigidez, además de que se presentan en la infancia, por lo general antes de los 6 años de edad.⁷⁶

Son frecuentes los movimientos involuntarios en las extremidades, acompañados de corea y parkinsonismo, lo que puede provocar fracturas espontáneas por la combinación de la tensión ósea y osteopenia; esta afección se produce cuando el cuerpo no fabrica tejido óseo con la misma rapidez con la que absorbe el antiguo tejido óseo.⁷⁶

El síntoma más común de la forma típica es deterioro de la marcha, resultado de la rigidez de las extremidades, distonía y espasticidad.

La distonía puede ocasionar trauma en la lengua y requerir la extracción dentaria, además de la dificultad de deglutir, lo que provoca desnutrición y muerte prematura por neumonía o broncoaspiración.⁷⁶

El deterioro cognitivo es característico en alteraciones del *PKAN* clásico, los pacientes pueden presentar alteraciones psiquiátricas (trastorno obsesivo compulsivo, manías, psicosis y depresión).⁶⁶

Los síntomas visuales son los que en general llevan al paciente a consulta médica, por presentar restricción de campos visuales secundarios a retinopatía pigmentaria (se presenta en 2/3 de los pacientes), cursando con nictalopía, pérdida del campo visual periférico y eventualmente ceguera; los pacientes sufren episodios de deterioro intercalados con periodos de estabilidad, por lo que la esperanza de vida es variable.⁷⁶

- 2) Atípica.- (25% de los casos), las características clínicas son variadas no siendo éstas de carácter precoz. Los síntomas son menos intensos y menos progresivos, la edad de inicio suele ser más tardía respecto a los casos clásicos, ya que en general tiene inicio en las tres primeras décadas de vida, no obstante, puede iniciar desde los 13 años de edad.²³

Los primeros síntomas suelen ser distonía focal y temblores distónicos intercalados con defectos del habla como la palilalia, taquilalia y disartria.

La retinopatía pigmentaria es rara en la forma atípica, pero puede presentar tics motores y verbales, aunque la afección motora suele ser tardía y puede confundirse con la enfermedad de Parkinson, ya que es posible observar “congelación” y temblores esenciales.²³

Los síntomas psiquiátricos incluyen cambios en la personalidad con impulsividad, estallidos de violencia, depresión y labilidad emocional. Esta forma atípica de presentación de la enfermedad por *PKAN* corresponde a las fenocopias de la EH o Huntington-like.²³

3.2.13 Epidemiología.

La enfermedad de Hallervorden Spatz es una afección poco frecuente con un rasgo genético autosómico recesivo, ocurre en todas las poblaciones y tiene una frecuencia similar en ambos sexos, se ha estimado una prevalencia de 1 a 3 en 1,000,000 de habitantes. El inicio típico ocurre en la infancia (PKAN clásica), aunque también puede desarrollarse en la segunda y tercera década de la vida, es decir, en adolescentes o en individuos durante etapas temprana de la vida adulta (PKAN atípica), posterior a este periodo su manifestación es rara. De los 6 a los 15 es la edad común de inicio de los síntomas, cuando se desarrolla en la niñez son más severos los síntomas y la mayoría tiene un desenlace fatal entre 2 a 10 años.⁷⁷

En un 3 a 5% de los pacientes no se presentan mutaciones o solo se identifica una mutación heterocigota, por ello, el análisis de delección/duplicación del gen debe ser considerado.²³

Este análisis de delección/duplicación de nombre amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) es un método reciente, basado en la reacción en cadena de la polimerasa de cuantificación relativa del número de copias normales y anormales de ADN de hasta 40 secuencias genómicas.⁷⁸

3.2.14 Síntomas.

Al ser la enfermedad de Hallervorden Spatz un tipo de enfermedad Huntington-like, es evidente que los síntomas son muy similares entre los dos padecimientos, entre las manifestaciones que se presentan en la enfermedad de Hallervorden Spatz se encuentran:

- ❖ Distonías (respiratorias y digestivas) y problemas del balance.- Primer síntoma es la dificultad para moverse y caminar, ésto empeora con el tiempo y afecta a los brazos también.
- ❖ Disartria.- dificultad del habla, en general es uno de los primeros síntomas, y se caracteriza por la repetición de palabras o frases, discurso rápido y mala articulación de palabras.
- ❖ Bradipsiquia.- Síntoma relacionado con trastornos mentales que ralentizan el pensamiento y la capacidad de razonar.
- ❖ Problemas del habla, masticación y deglución- Provocado por la distonía que afecta los músculos de la boca y la garganta.
- ❖ Deterioro mental.- El funcionamiento cognitivo varía de persona a persona, ya que a algunos pacientes se ven más afectados que otros.
- ❖ Alteraciones visuales.- Pérdida de la visión periférica y ceguera nocturna, provocado por la retinitis pigmentaria.
- ❖ Problemas del movimiento.- Corea, parkinsonismo, marcha atáxica, temblores, espasticidad.
- ❖ Síntomas psiquiátricos.- Problemas de conducta, cambios de personalidad, episodios de rabia y depresión.⁵⁴

La enfermedad puede ser estable durante cierto periodo de tiempo y después sufrir intervalos de deterioro rápido; a medida que los pacientes envejecen, pueden perder el control de los movimientos voluntarios; además, al combinarse los espasmos musculares con la disminución de la masa ósea, se pueden provocar fracturas.⁶⁸

La presentación clínica se caracteriza por la rápida progresión de la disfunción extrapiramidal y declive intelectual a una edad temprana. Los hallazgos en la resonancia magnética (RM) y la retinopatía pigmentaria son signos característicos del padecimiento.⁶⁶ La presencia de síntomas psicóticos, sin embargo, no aparece descrita más que en pocos referenciados en la literatura.⁷⁹

3.2.15 Diagnóstico.

El diagnóstico de Hallervorden Spatz se basa en la historia clínica, pruebas especializadas y la evaluación clínica, para ello se les realizan:

- Exámenes neurológicos para evaluar la distonía, la rigidez, los movimientos anormales, la espasticidad y el habla.
- Exámenes oftalmológicos para evaluar la posible retinopatía.
- Exámenes y evaluaciones de desarrollo para la terapia física, ocupacional y del habla.

En ocasiones se sospecha del padecimiento, al observarse en la resonancia magnética cerebral el signo característico llamado “ojo del tigre” o la retinopatía pigmentaria. El diagnóstico se confirma con el análisis genético que muestra mutaciones en el gen *PANK2*, aproximadamente el 95% de los pacientes tienen dos mutaciones identificables en el gen, el otro 5% tienen una mutación identificable.⁵⁴

Tanto para la PKAN típica, como la atípica, el diagnóstico se confirman por la presencia de variantes genéticas patológicas en el gen *PANK2*, el análisis de secuenciación es recomendado después de evidenciar hallazgos en la resonancia magnética, misma que es sensible a la presencia y concentración de hierro en el cerebro, donde se observa el signo conocido como “ojo de tigre”.⁵⁴

3.2.16 Imagenología.

La Resonancia Magnética (RM) es sensible a la presencia y concentración de hierro no hemo en el cerebro en la secuencia ponderada en T2 (tiempo de relajación transversal) de la resonancia magnética cerebral; en ella se evidencia hiperintensidad en el globo pálido por la vacuolización y gliosis del tejido, rodeado

de halo hipointenso por depósito de hierro hallado en las autopsias con alta correlación con la mutación en el gen *PANK2*.²³

La enfermedad de Hallervorden Spatz presenta una imagen típica en la fase presintomática de los casos clásicos y atípicos al presentar el signo de “ojo de tigre”; sin embargo, este signo no es patognomónico de este padecimiento, ya que se ha observado que los adultos pueden presentar el signo en las neuroimágenes con síntomas de enfermedad neurológica, sin que signifique mutación en el gen; ésto puede deberse a la combinación entre el proceso de envejecimiento asociado a otras condiciones patológicas que pueden dar lugar a este signo en adultos, por lo que es necesario realizar los estudios moleculares para establecer el diagnóstico correcto.²³

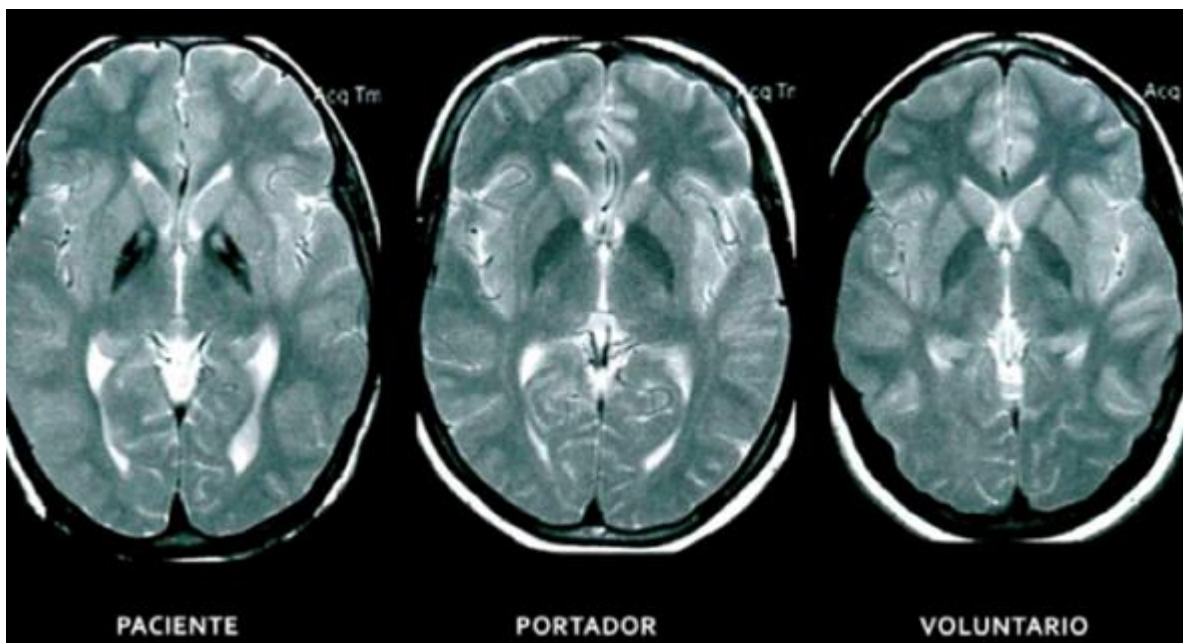


Figura 11: Resonancia magnética (ojo de tigre) que muestra el contenido de hierro del globo pálido aumentado en el paciente con PKAN, comparado con un portador de la mutación en un alelo del gen *PANK2* y un control sano.⁸²

3.2.17 Retinopatía pigmentaria (RP).

Degeneración bilateral lentamente progresiva de la retina y el epitelio pigmentario retiniano, causada por distintas mutaciones genéticas; la RP puede aparecer como enfermedad propia o estar asociada a otras patologías oculares o sistémicas, como sería en el sistema nervioso central, donde se producen enfermedades degenerativas que provocan afectación de los músculos y alteraciones metabólicas.⁸³

Los síntomas incluyen ceguera nocturna y pérdida de visión periférica, muestra pigmentación oscura en forma de espículas óseas en la retina ecuatorial que estrecha las arteriolas retinianas (Figura 11), causando palidez cérica de la papila, cataratas subcapsulares posteriores y células en el vítreo. Para retardar la progresión de estos síntomas, ayuda la administración de palmitato de vitamina A, los ácidos grasos ω -3 y luteína + zeaxantina.⁸⁴

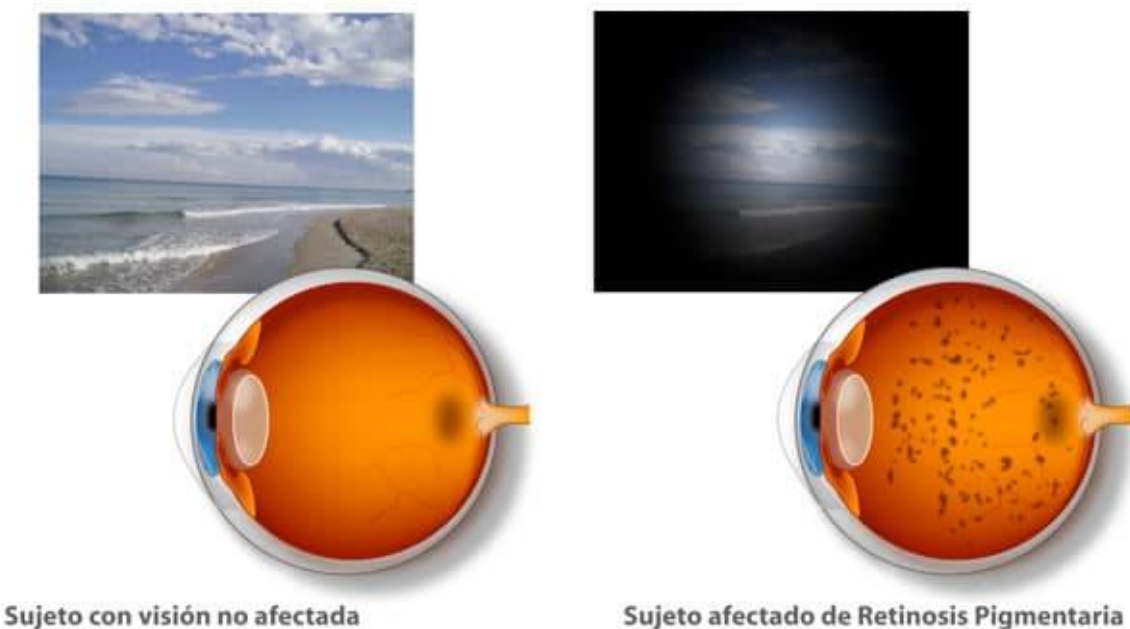


Figura 12: Comparación entre el ojo de un individuo sano y un paciente con retinosis pigmentaria, donde se muestran los depósitos de pigmentos conocidos como “espículas óseas”.⁸³

3.2.18 Tratamiento.

Como en la mayoría de las enfermedades genéticas, no existe cura; tampoco existe procedimiento específico para la enfermedad de Hallervorden-Spatz, es por esto que el objetivo del tratamiento depende de los síntomas que presenta el paciente y el conocimiento de la patogénesis bioquímica de la misma, como son:

- 1.- La disminución de los niveles de CoA en la mitocondria.
- 2.- El incremento de las concentraciones de cisteína.
- 3.- La elevación del estrés oxidativo.
- 4.- La acumulación de hierro en el cerebro.⁸⁰

Entre los procedimientos que se pueden llevar a cabo dependiendo de los síntomas de los pacientes se encuentran:

- ◆ Medicación: Terapia quelante para la eliminación de metales pesados; los temblores responden mejor a los medicamentos dopaminérgicos; las benzodiazepinas se utilizan para mejorar la contracción muscular y los movimientos de torsión y contorsión; la distonía se trata con trihexifenidilo oral; baclofeno oral o un bolo de baclofeno intratecal y clonazepam oral, la disartria mejora al controlar la distonía, con la administración de la toxina botulínica intramuscular que se utiliza para espasmos musculares; el bromuro de metilscopolamina puede usarse para evitar el babeo excesivo; el parkinsonismo responde al tratamiento con levodopa-carbidopa y bromocriptina; la coreoatetosis puede ser controlada con diazepam. Un estudio reciente mostró buenos resultados con el medicamento fosmetpantotenato, mismo que restaura los niveles de CoA.⁸¹
- ◆ Procedimientos quirúrgicos: Los procedimientos para destruir partes específicas del cerebro, el globo pálido o el tálamo pueden proporcionar alivio temporal para la distonía.

- ◆ Estimulación cerebral profunda: Se implanta un dispositivo médico llamado marcapasos cerebral para evitar impulsos eléctricos a partes específicas del cerebro para el tratamiento del movimiento y trastornos afectivos.
- ◆ En caso de ceguera se recomienda acudir a programas educativos para ciegos .
- ◆ Fisioterapia y terapia ocupacional para mantener la movilidad normal de las articulaciones.
- ◆ Ayudas adaptativas (andador, silla de ruedas), para anomalías de la marcha.
- ◆ Terapia del habla y/o dispositivos de comunicación: Los fármacos que reducen los niveles de hierro en el cuerpo (quelación de hierro), pueden ser efectivos en algunos casos, al igual que los suplementos de vitamina B5 en pacientes con PKAN atípico.⁵⁴

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A pesar de que las enfermedades Huntington-like no tienen una alta incidencia, es importante identificar lo que las causa, ya que ante un resultado negativo del estudio molecular de la EH, se abre un amplio abanico de enfermedades. Los individuos afectados requieren conocer qué está causando su padecimiento, cuáles son sus riesgos para su descendencia y si hay un tratamiento, por lo que es de suma importancia realizar el análisis de los genes que causan estas enfermedades Huntington-like o de las fenocopias de Huntington ya que son hereditarias, con un patrón de herencia diferente a otras que son autosómicas dominantes y otras autosómicas recesivas. Esto cambia los riesgos y la probabilidad de que la progenie desarrolle la enfermedad a lo largo de su vida, ya que dependiendo del gen y del tipo de mutación de la enfermedad, puede presentarte a edades tempranas o tardías. Entre estas causas están las variantes genéticas del gen *PANK2*, que a pesar de ser poco frecuente, tienen gran relevancia por toda la patología que desencadenan. Por lo antes mencionado, es necesario dar un diagnóstico certero y

asesoramiento genético, así como el esencial desarrollo de algoritmos clínicos, a fin de ir descartando genes que provoquen enfermedades Huntington-like, además de continuar el análisis de los genes en un orden estratégico para poder dar el tratamiento adecuado, que es uno de los objetivos en el Instituto de Neurología y Neurocirugía. Asimismo, es importante se permita en nuestro país dar a conocer cómo se distribuyen y la frecuencia de estos padecimientos.

5. HIPÓTESIS.

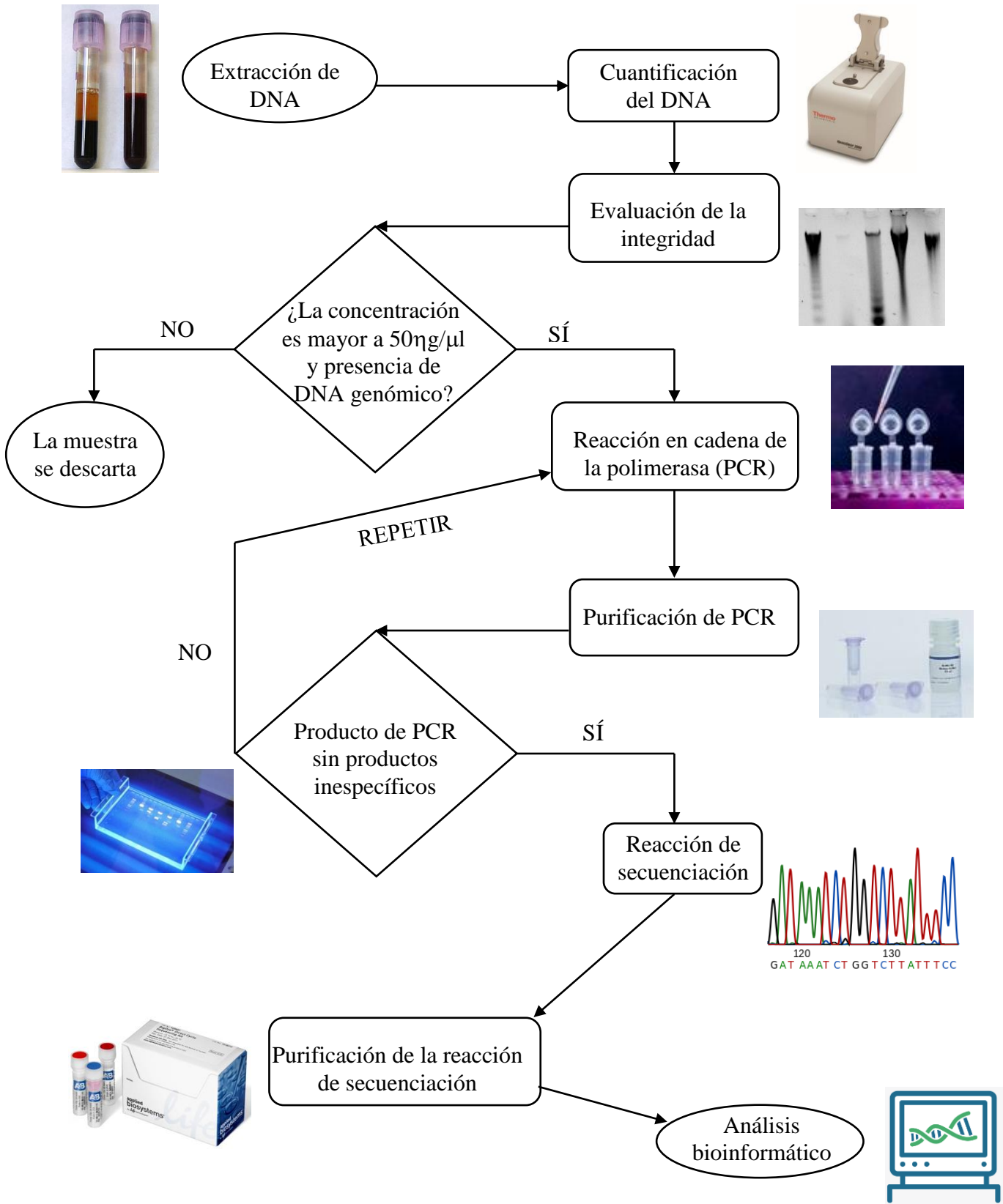
Las variantes en el gen *PANK2* provocarán modificaciones estructurales en la configuración de la enzima pantotenato cinasa; estas variantes son las responsables de las patologías que fenocopian a la enfermedad de Huntigton.

6. OBJETIVO.

Identificar variantes génicas en los exones 2, 6 y 7 en el gen *PANK2* mediante su secuenciación y análisis bioinformático, en pacientes con probable Huntington-like.

7. METODOLOGÍA.

La metodología general se explicará de manera resumida en el siguiente diagrama, los procedimientos realizados se presentan a detalle posteriormente.



7.1 Población de estudio.

Pacientes.

Se analizaron un total de 102 pacientes como probables fenocopias de la EH o casos con Huntington-like, de los cuales 66% fueron mujeres y el 34% fueron hombres, en edad promedio mayor a 30 años, a quienes previamente se les realizó el diagnóstico para la EH el cual fue negativo, ya que presentaron un número de repetidos del triplete CAG, con un promedio de 18.82 repetidos (rango normal de 9 a 26 repetidos):

1.- Criterios de inclusión:

Individuos diagnosticados como casos probables de Huntington-like que ya tuvieron resultados negativos para los análisis de los genes: *HTT*, *JPH3*, *PRNP* y *TBP*.

2.- Criterios de exclusión:

Individuos que no cumplieron los criterios clínicos de la enfermedad de Huntington o que obtuvieron resultados positivos en los genes: *HTT*, *JPH3*, *PRNP* o *TBP*, al igual que los pacientes que no aceptaron participar.

Para la realización del análisis se incluyeron muestras del banco de DNA de pacientes con diagnóstico de Huntington-like, y las muestras que fueron captadas durante el desarrollo del proyecto. A cada uno de los pacientes se les tomó una muestra de sangre periférica mediante venopunción, previo consentimiento informado (Anexo 1) para comenzar el proceso mostrado en el diagrama anterior, iniciando con:

7.2 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica.

Se extrajo el DNA genómico de las muestras de sangre periférica mediante el método de sales de Miller.⁸⁵

1.- Se transfirieron 3mL de sangre periférica a tubos Falcon de 15mL, a los que se adicionaron tres veces el volumen (9 mL) de buffer BLGR (buffer para lisis de glóbulos rojos) que contiene EDTA 0.5mM, KHCO₃ 10mM, NH₄Cl 0.15M y con un pH de 7.4.

2.- Se homogenizaron por inversión, se centrifugaron a 3000 rpm durante 6 minutos y se desechó el sobre nadante (mediante decantación).

3.- Se adicionó 1mL de buffer BLGR para resuspender el botón obtenido, mismo que se homogeneizó y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, éste se centrifugó a 3000rpm durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante, con cuidado de no perder el botón de glóbulos blancos. Este paso se repitió hasta que el botón quedara limpio.

4.- Al botón de glóbulos blancos se le adicionaron 570µL de solución de NaCl 5mM y se agitó por alrededor de 2 minutos, posteriormente se agregaron 40µL de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10%, solución utilizada para degradar la membrana celular, de igual manera se agitó por aproximadamente 2 minutos. Por último, se agregaron 200µL de NaCl saturado (7M), toda la mezcla se agitó por 10 minutos, esto provoca la precipitación de las proteínas.

5.- Se centrifugó a 11,500 rpm por 20 min a una temperatura de 6°C, el sobrenadante obtenido se decantó en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, donde se adicionaron 600µL de cloroformo: Alcohol isoamílico (49:1), lo cual permite la separación del DNA de los otros compuestos remanentes como los lípidos de las membranas.

6.- La mezcla obtenida anteriormente se homogeneizó y se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 6°C, se separó la fase acuosa con ayuda

de una micropipeta y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5mL, posteriormente se adicionaron 600 μ L de etanol absoluto, lo que provoca la precipitación del DNA

7.- Se centrifugó a 14,000rpm por 20 minutos a 6°C, se decantó el sobrenadante y el DNA se lavó con 600 μ L de etanol al 70%, centrifugando nuevamente a 14,000rpm durante 15 minutos a 6°C.

8.- Se decantó el sobrenadante y se secó la muestra en el concentrador de vacío (Concentrator 5301 Eppendorf) a temperatura ambiente entre 15 a 20 minutos, transcurrido el tiempo y ya con la muestra seca se resuspendió el DNA en agua estéril en un volumen entre 100 a 300 μ L, para almacenarlas a 4°C y posteriormente medir el rendimiento y calidad del DNA obtenido.

7.3 Cuantificación del DNA.

Se determinó la concentración y la pureza de cada muestra utilizando un espectrómetro de UV-visible (equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer) a dos longitudes de onda, a 260nm, la que corresponde a la lectura de los ácidos nucleótidos y la longitud de 280nm, que corresponde a la lectura de las proteínas.

Para realizar la cuantificación es necesario:

1.- Calibrar el equipo con 2 μ L de agua estéril y se limpia el lector.

2.- Mezclar la muestra para homogeneizarla.

3.- Colocar la muestra en el lector, el resultado de la concentración es expresado en η g/ μ L, como de las longitudes A_{260}/A_{280} , los cuales son indicativos de la pureza del DNA obtenido.

Al finalizar la cuantificación es necesario preparar diluciones de las muestras de DNA a una concentración de 50 η g/ μ L, que es la concentración necesaria para llevar a cabo la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

7.4 Análisis de la integridad del DNA.

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, el procedimiento para el gel fue el siguiente:

- 1.- Se pesó 1g de agarosa en la balanza analítica (Denver Instrument Company AA-200), se disolvió en un matraz Erlenmeyer con 100mL de PBS 1X (buffer fosfato salino) compuesto de NaCl 2.6M, NaH₂PO₄ 0.6M, KCl 0.05M, y KH₂PO₄ 0.03M.
- 2.- La mezcla se calentó hasta formar una solución homogénea.
- 3.- Se adicionaron 2 μ L de bromuro de etidio (10mg/mL) y se homogeneizó.
- 4.- La mezcla se vertió en un porta-gel con peines, que forman los pocillos donde se colocarán las muestras.
- 5.- Se dejó solidificar el gel por aproximadamente 1 hora, se retiraron los peines, se separó el gel y éste se colocó en la cámara de electroforesis.
- 6.- Se llenó la cámara de electroforesis (Enduro Gel XL Labnet) de buffer PBS 1X hasta que cubra el gel de agarosa completamente.
- 7.- Se tomaron 2 μ L de la muestra de DNA y se mezclaron con 2 μ L de colorante de carga.
- 8.- Se colocó cada una de las muestras mezclada con el colorante en los diferentes pocillos del gel y se llevó a cabo la electroforesis a 100V por 20 minutos.
- 9.- Transcurrido el tiempo el gel se analizó en un fotodocumentador (Gel doc de Bio-Rad) colocándolo sobre un transiluminador de la luz UV (Transiluminador Tm-26 Labnet).

7.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se estandarizó la PCR mediante gradientes de temperatura con diferentes enzimas y concentraciones de los oligonucleótidos, de manera que la amplificación de los 7 exones del gen *PANK2* fuera la más óptima (Figura 12).

Exón		Oligonucleótido sentido (5'-3')		Oligonucleótido antisentido (5'-3')	T _m (°C)	Tamaño del producto (pb)
1	1F	ATCCGGGGTTCGCCCCAGGAGAGTT	1R	ACACTGTCCCCGCACGGTGGT	56.6	825
2	2F	GTTGCTACTGTGGTAAGGGT	2R	AATGCCAGTAGCAAGTGGTG	54.6	498
3	3F	TGGTTGTTTCACGTAGTGGG	3R	CGGGCTGAGTTTTTCAGGTAT	54.6	411
4	4F	GCATGATTGGGTTGGATATGTG	4R	CGGTGGCTCATGCCTTTAAT	55.6	350
5	5F	GTTCTGTTGGGCTTTGTTGC	5R	CCCATCACGTCTGTTTTCTC	54.6	260
6	6F	GCTATGCACATGGTGCTGTA	6R	AGTTCCATGACAGTGTGACC	54.6	284
7	7F	GGGCAGTGGTTGGCTTTAACA	7R	GAAAGTCCACAGATCCCATTG	59.0	201

Tabla 6: Secuencias de los oligonucleótidos del gen PANK2 utilizados para la amplificación de los 7 exones de los últimos pacientes, y sus temperaturas de alineamiento (T_m).

La mezcla enzimática con la mejor eficiencia para la reacción en cadena de la polimerasa fue **KAPA2G Robust HotStart** (Figura16), que contenía los siguientes elementos:

*Enzima DNA polimerasa *KAPA2G Robust HotStart*

*Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), con una concentración de 10mM para cada dNTP.

*5x KAPA Buffer A, B o GC para PCR *KAPA2G Robust HotStart*

*Enhancer.

Ya establecidas las condiciones óptimas de amplificación, se preparó la mezcla de reacción que contenía los reactivos que se muestran en la siguiente tabla:

Reactivo	Concentración	Exón 2	Exón 6	Exón 7
Mezcla KAPA2G Robust HotStart	1X	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Primer forward	10/25 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Primer reverse	10/25 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L
DMSO	Según se requiera	_____	1.25 μ L	_____
DNA genómico	~ 200 η g/ μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
H₂O c.b.p.	_____	11 μ L	9.8 μ L	11 μ L

Tabla 7: Protocolo PCR con la enzima Kapa2G Robust HotStar Ready Mix, condiciones que establece el proveedor.

La reacción PCR se realizó en el termociclador (Axygen), mismo en que se podían realizar las reacciones de todos los exones a la vez, ya que permite realizar la amplificación a diferentes T_m.

El programa descrito en la siguiente Figura 12, también se estandarizó y estableció previamente.

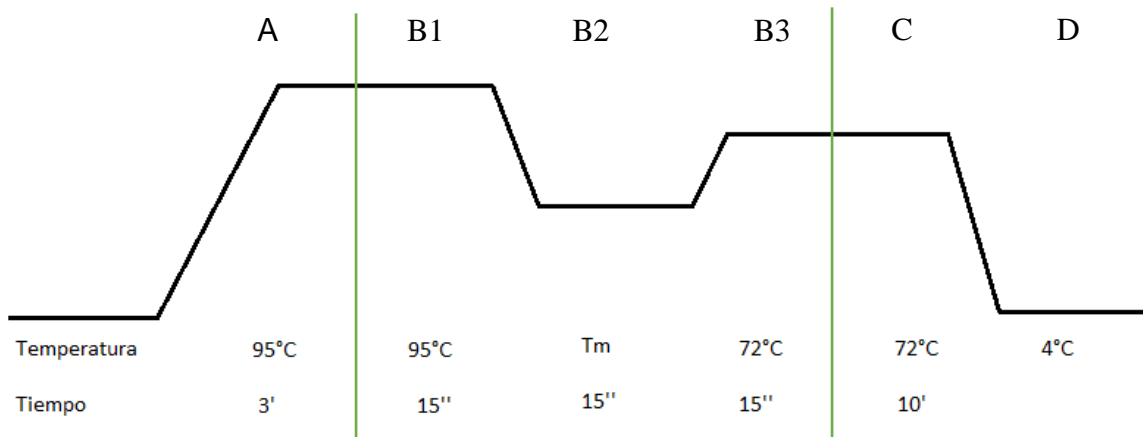


Figura 13: Termociclo utilizado para llevar a cabo la amplificación de los exones 2, 6 y 7 del gen PANK2 mediante la técnica de PCR. A) Desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, B) 35 ciclos con tres temperaturas diferentes: B.1) desnaturalización a 95°C por 3 minutos B.2) alineamiento de los oligonucleótidos Tm (Tabla 4), B.3) extensión del templado a 72°C cada una con una duración de 15 segundos, C) Extensión final a 72°C con una duración de 10 minutos, D) Almacenamiento a 4°C.

7.6 Análisis de productos de PCR

Se verificó la integridad y el tamaño de los productos de PCR esperados para cada exón analizado, comparado con un marcador de peso molecular conocido y resueltos en un gel de agarosa el 2%.

Electroforesis.

1. En el primer pocillo del gel de agarosa al 2% ya previamente colocado en la cámara de electroforesis con buffer PBS 1x, se depositó 1µL del marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder Axygen), con un rango de 100 a 1000 pb para confirmar el tamaño de los productos de PCR obtenidos, y en el resto de los pozos se colocaron los productos de PCR.

2. El corrimiento electroforético se realizó a 100V por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se colocó el gel en el transiluminador del fotodocumentador para observar las bandas en comparación con el marcador de peso molecular.

7.7 Purificación de los productos de PCR.

Se empleó el estuche comercial (QIAquick PCR Purification Kit) para la eliminación de nucleótidos no incorporados.

El procedimiento recomendado por el proveedor es el siguiente:

1. Añadir 200 μ L de buffer PBI o PB al producto de amplificación y homogeneizar, la muestra se colocó en una columna de purificación, colocada sobre un tubo colector.
2. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 650 μ L de buffer PE, se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos y de igual manera se desechó el sobrenadante.
3. Se colocó la columna de purificación dentro de un tubo Eppendorf de 1.5mL y se añadió el volumen de agua estéril (25 μ L), se dejó reposar por algunos minutos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos, Se colecta el producto purificado en un tubo de microcentrífuga estéril.

Es necesario repetir el proceso de electroforesis en gel de agarosa al 2% a los productos de purificación de PCR, con el fin de corroborar que no se perdió la muestra en el transcurso de la purificación, y conocer la cantidad óptima del producto purificado que se utilizará en la reacción de secuenciación.

7.8 Reacción de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)
BigDye	1X	1.0
Buffer Terminator	5X	3.5
Purificado de PCR	*	1.0
Oligonucleótido (Forward o Reverse)	10 μM	1.0
H ₂ O c.b.p.	_____	13.5
	Volumen final	20.0 μL

Tabla 8: Reactivos empleados para llevar a cabo la reacción de secuenciación de los exones 2, 6 y 7 del gen PANK2. *La concentración del purificado de PCR se estima con base en la intensidad de la banda en el gel de agarosa 2%, que comparado con el marcador de PM nos da un estimado de la concentración. Cuando la banda de la muestra se visualizaba intensa se adicionaba 1 μL del purificado de PCR, en caso de que el purificado se visualizara con menos intensidad se adicionaban entre 2 a 3 μL , por lo que el volumen de agua disminuía para obtener un volumen final de 20 μL .

La reacción de secuenciación se realizó en el termociclador (Maxygene II) utilizando el siguiente termociclado que se muestra en la Figura 13:

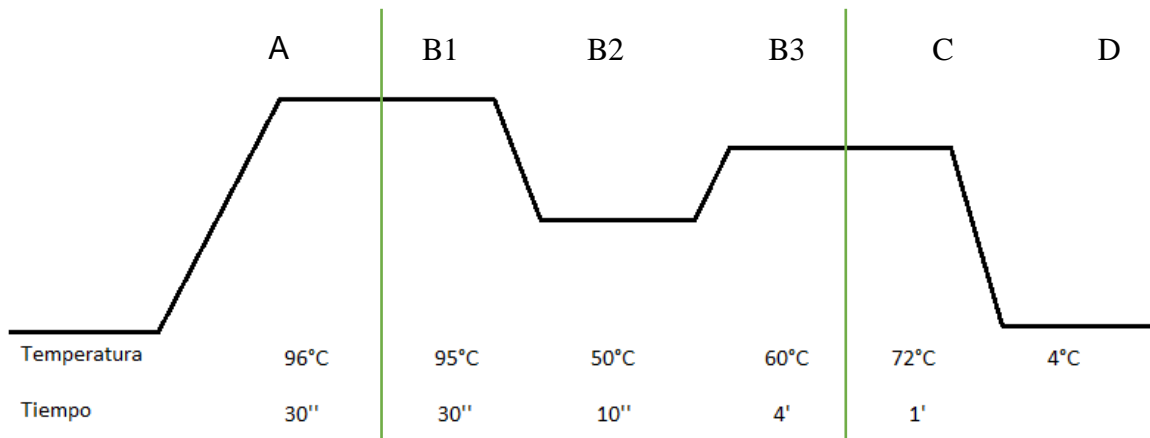


Figura 14: Termociclado utilizado para llevar a cabo la reacción de secuenciación de los exones 2, 6 y 7 del gen PANK2. A) Desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, B) 30 ciclos con tres temperaturas diferentes: B.1) desnaturalización a 95°C por 30 segundos, B.2) alineamiento del oligonucleótido (Forward o Reverse) a 50°C por 10 segundos, B.3) extensión del templado a 60°C con una duración de 4 minutos, C) Extensión final a 72°C con una duración de 1 minuto, D) Almacenamiento a 4°C.

7.9 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación.

Para poder realizar la purificación de los productos de secuenciación fue necesario preparar las columnas de Centrisep:

1. Anticipadamente se hidrataron (24 horas previo a su uso), las columnas adicionando 700µL de agua estéril.
2. Para eliminar el agua se quitó el tapón inferior, se colocaron las columnas dentro de tubos colectores, se colocó y quitó la tapa superior de la columna en repetidas ocasiones para filtrar el agua.
3. Se drenó el agua de las columnas centrifugándolas a 3000 rpm por 2 minutos y se desechó el sobrenadante.
4. Se insertó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL y se adicionó el producto de la reacción de secuenciación en el centro de la columna, sin tocar el Sephadex.

5. Se centrifugaron las columnas con las muestras a 3000 rpm durante 2 minutos.
6. La muestra purificada se secó empleando un concentrador de vacío (Eppendorf Concentrator 5301), por aproximadamente una hora, hasta que la muestra estuviera totalmente seca.

7.10 Secuenciación automatizada.

El producto seco se resuspendió con 14 μ L de formamida ultrapura, y se colocaron en una placa de secuencia de 96 pozos. Se desnaturalizó a 94°C por 5 minutos en el termociclador (Thermal Cycler 2720 Applied Biosystem). Por último, se realizó el análisis en el secuenciador automatizado de DNA (Genetic Analyzer 3131 de Applied Biosystem).

7.11 Análisis de la secuencia.

Se utilizó el programa Sequencing Analysis 5.3 para analizar los electroferogramas obtenidos, se consultaron las bases de datos de NCBI, Ensemble y el programa bioinformático *Human Splicing Finder* (HSF).

8. RESULTADOS

8.1 Análisis de la integridad del DNA

Se realizó el análisis de integridad de DNA (Figura 15) a un total de 102 muestras, las cuales presentaron una concentración promedio de 342.8 η g/ μ L DNA genómico y una relación 260/280 promedio de 1.79 que nos indica que la pureza de la muestra es adecuada para continuar con el análisis.

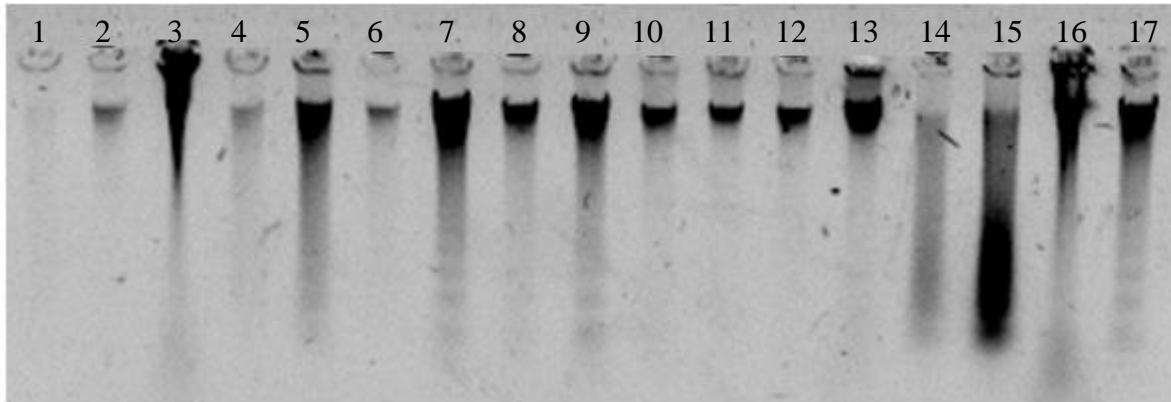


Figura 15: Gel de Agarosa al 1%, mismo que muestra la integridad del DNA genómico en diferentes muestras. Donde se puede observar que en la muestra 1 ya no hay presencia de DNA, en la muestra 14 y 15 la mayoría de DNA presenta degradación; en las muestras 2, 4 y 6 la concentración de DNA es baja, a pesar de que en general es DNA genómico, las demás muestras a pesar de que algunas presentan degradación, tienen una alta concentración de DNA genómico.

8.2 Análisis de los productos de PCR.

En la Figura 16 se muestra la imagen de un gel de agarosa al 2% con los productos de PCR esperados para los exones 2, 6 y 7 del gen PANK2. Se probaron dos DNA polimerasas termoestables, Robust y HotStart, en la Figura 16 se observa que la DNA polimerasa Robust tuvo una mayor eficiencia de amplificación para todos los exones.

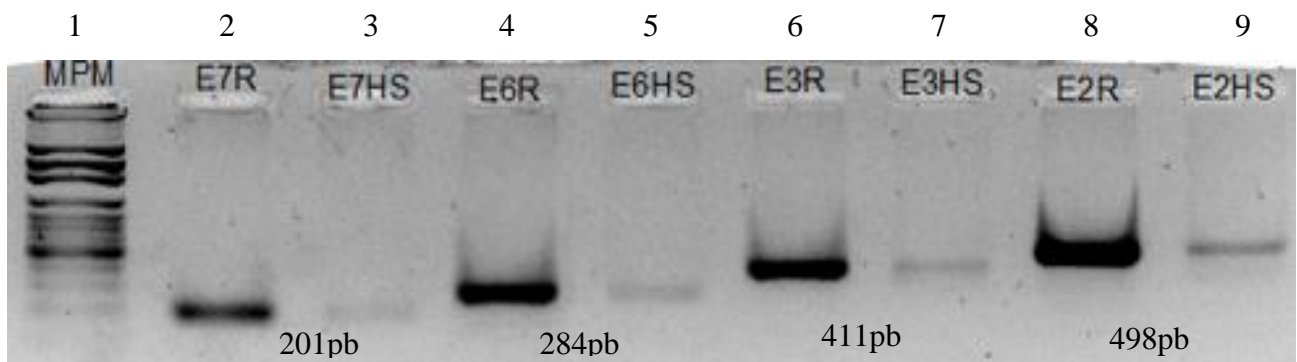


Figura 16: Productos de PCR analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% empleando dos enzimas taq polimerasa para su amplificación, donde se observan los amplicones de los exones 2, 3, 6 y 7. En el exón 2 se observó una banda de 498 pb como se muestra en los carriles 8 y 9, mientras que para el exón 3 el tamaño fue de 411 pb y se observan en los carriles 6 y 7. El exón 6 presenta

un producto de 284 pb se ubica en los carriles 4 y 5, y el exón 7 se ubica en los carril 2 y 3 con un tamaño de 201 pb. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular DNA Ladder Axygen con un rango de 100 a 1000 pb que nos permite confirmar el tamaño de cada exón. (R= enzima Robust, HS= enzima HotStart).

8.3 Variantes génicas de los exones 2,6 y 7 del gen *PANK2*.

El análisis de la secuenciación de los exones 2, 6 y 7 del gen *PANK2* en las 100 primeras muestras de pacientes, no se encontraron variantes patológicas ni benignas en ninguno de los exones estudiados. Se muestran imágenes (Figuras 17, 18 y 19) de los electroferogramas de cada uno de los exones estudiados, cuya secuencia es normal.

8.3.1 Electroferograma del exón 2.

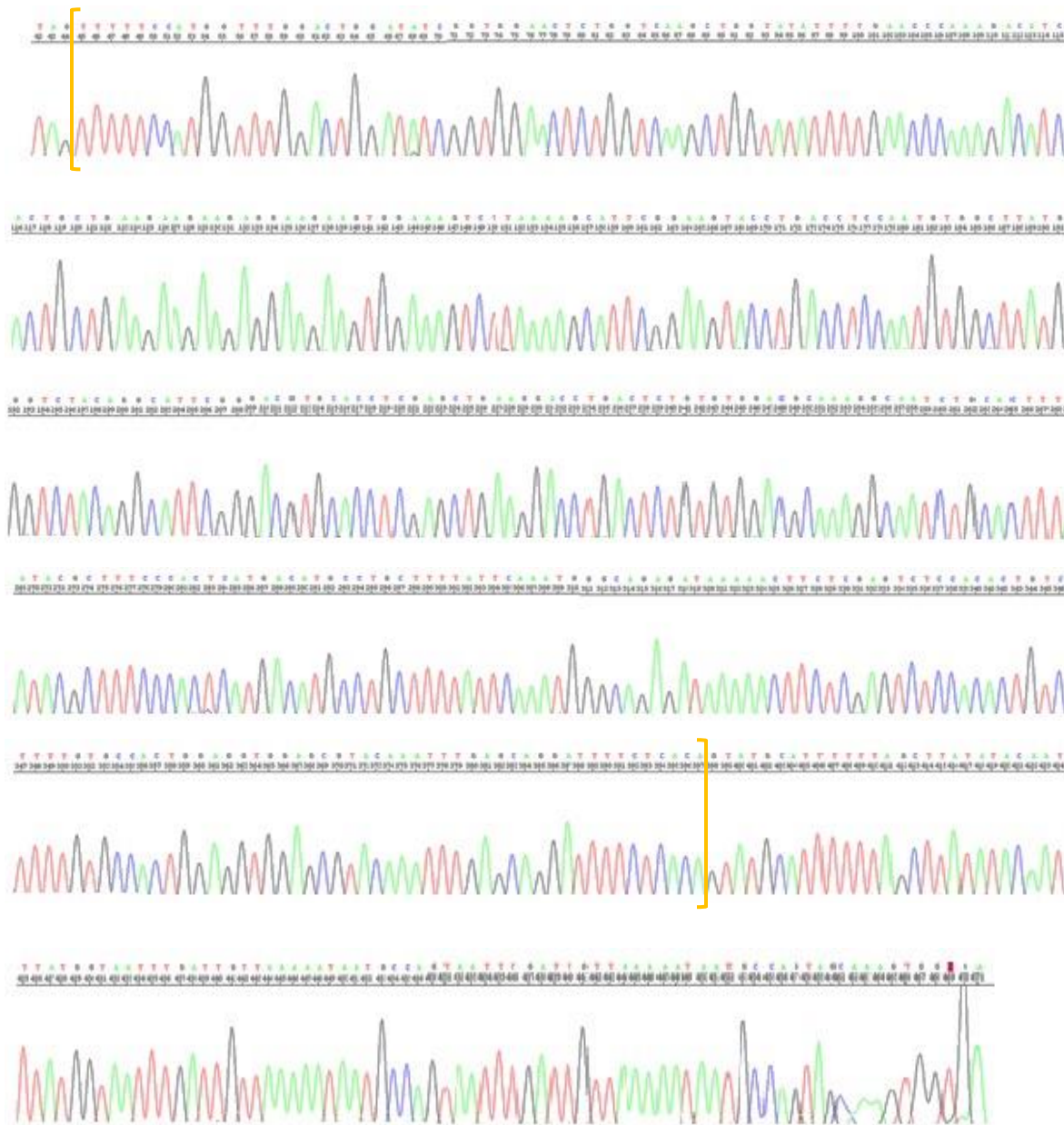


Figura 17: : Electroferograma de la secuencia del exón 2 de 498 pb (señalado con corchetes) y parte de la zona intrónica, en las que no se encontraron variantes genéticas. Bases nitrogenadas: Rojo: Timina (T), Azul: Citosina (C), Negro: Guanina (G) y Verde: Adenina (A).

8.3.2 Electroferograma del exón 6.

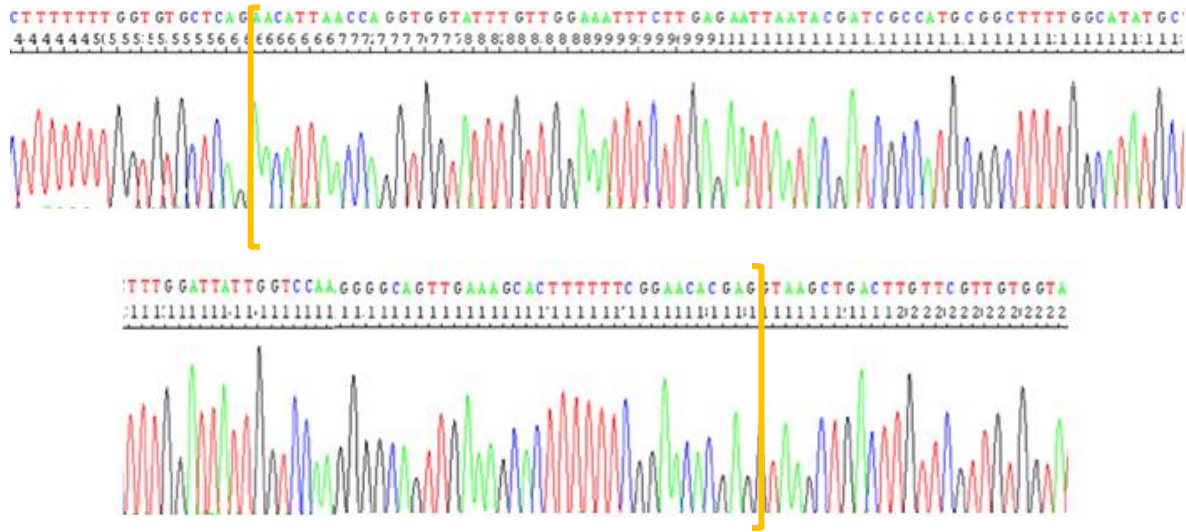


Figura 18: Electroferograma de la secuencia del exón 6 de 284 pb (señalado entre corchetes) y parte de la zona intrónica, en las que no se encontraron variantes genéticas. Bases nitrogenadas: Rojo: Timina (T), Azul: Citosina (C), Negro: Guanina (G) y Verde: Adenina (A).

8.3.3 Electroferograma del exón 7.

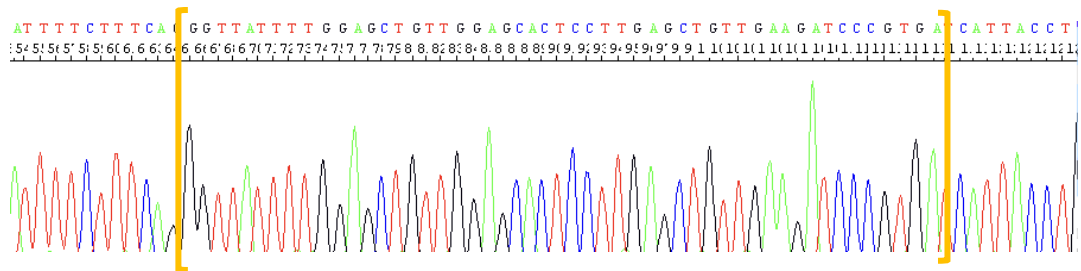


Figura 19: Electroferograma de la secuencia del exón 7 de 201 pb (señalando entre corchetes) y parte de la zona intrónica, en las que no se encontraron variantes genéticas. Bases nitrogenadas: Rojo: Timina (T), Azul: Citosina (C), Negro: Guanina (G) y Verde: Adenina (A).

Los resultados negativos obtenidos de los 100 primeros pacientes en los tres exones analizados, no descartan la posibilidad de encontrar variantes génicas en los exones no analizados en este estudio, siendo necesario continuar con el análisis de los exones 1,3,4 y 5 del gen *PANK2* para poder descartar la participación de este gen y por lo tanto a la enfermedad de Hallervorden Spatz, y continuar con el análisis de otros genes que pueden formar parte de los casos Huntington-like.

Se seleccionaron dos pacientes con los síntomas característicos de una enfermedad Huntington-like y que además presentaron en su resonancia magnética el signo de “ojo de tigre”, un signo tan característico de la enfermedad de Hallervorden Spatz, se les realizó el análisis del gen *PANK2* completo, es decir, los 7 exones (Figura 20) para confirmar o descartar el padecimiento en estos pacientes.

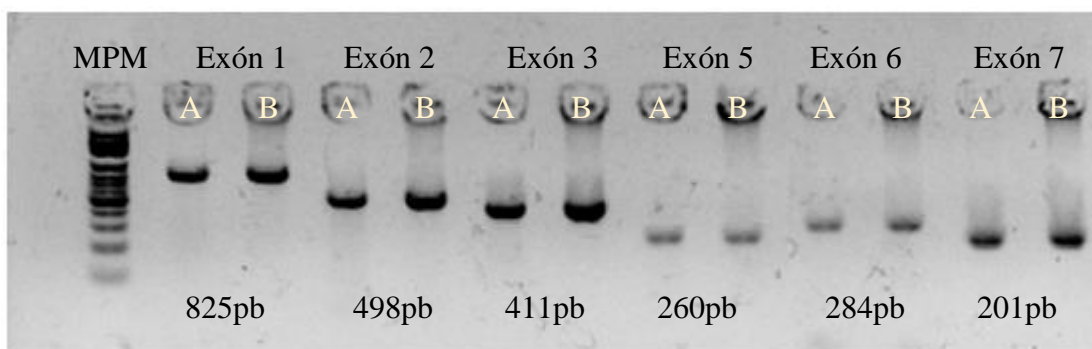


Figura 20: PCR de los exones 1, 2, 3, 5, 6 y 7 de los dos pacientes anteriormente mencionados. La A hace referencia al paciente de 6 años de edad y la letra B al paciente de 24 de edad. [El exón 4 no se logró amplificar, a pesar de realizar modificaciones al programa de amplificación de PCR, como la temperatura de fusión de los oligonucleótidos (T_m), la enzima, concentración de los primers, concentración de DMSO y el número de ciclos del termociclador].

8.4 Variantes encontradas.

Un paciente presentó una mutación génica en el codón 391 del exón 3, en la que se presenta una doble delección como se muestra en la Figura 21. La delección se confirmó por la secuenciación de ambas cadenas (Figuras 21B y 21C), esta delección provocó un cambio en el aminoácido de Valina a un codón de paro.

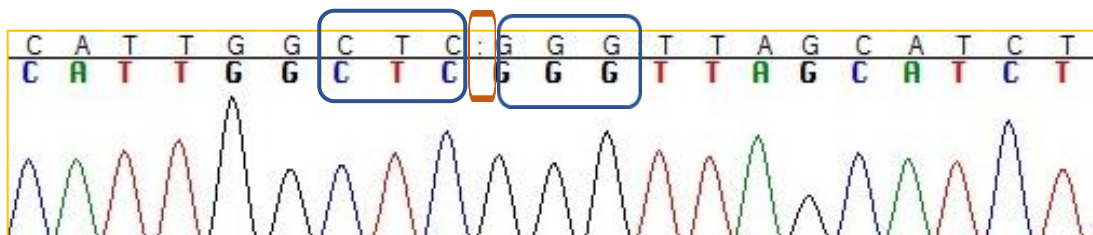
8.4.1 Paciente con PKAN clásica y la variante génica p.Ser392fs

A)



Delección de Adenina y Guanina

B)



C)

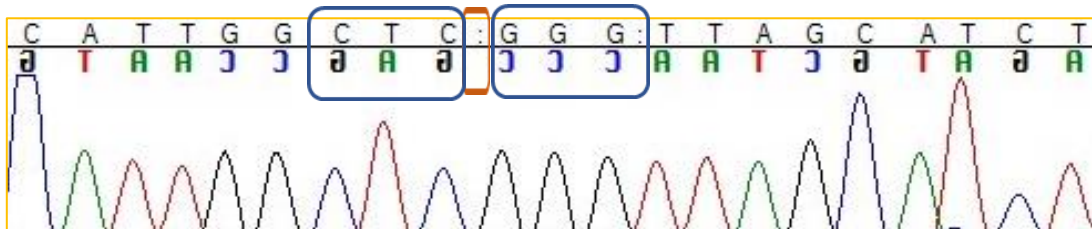


Figura 21: **Electroferogramas parciales del exón 3** (PKAN clásica). **A)** Secuencia control (alelo silvestre 5'- C T C A G G G G -3'), **B)** Secuencia sentido (Forward 5'- C T C del G G G -3'), **C)** Secuencia antisentido con la cual se

confirma la variante homocigota (Reverse 5'- G A G del C C C -3'). Provocando un cambio de aminoácido de Valina a un codón de paro.

Esta variante se presentó en un caso infantil, paciente masculino de 6 años de edad, siendo las primeras manifestaciones a los 6 meses de edad, con un retraso psicomotriz y más adelante del lenguaje. Con el paso del tiempo presenta movimientos involuntarios, discapacidad del lenguaje, debilidad muscular, torpeza en la marcha con caídas frecuentes, distonía desde los 4 años, movimientos coreoatetósicos distales, dificultades para hablar, fallas en el aprendizaje y retinosis pigmentaria. El inicio temprano y la gran severidad de los síntomas permiten establecer que se trata de una presentación clásica de la enfermedad. En la figura 22 se muestra en la RM la imagen de “ojo de tigre” característica de este padecimiento, para este paciente.

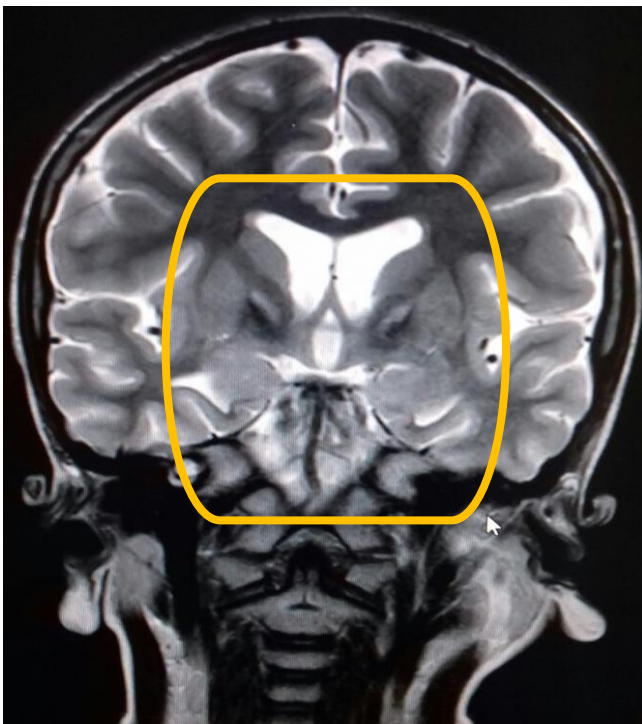
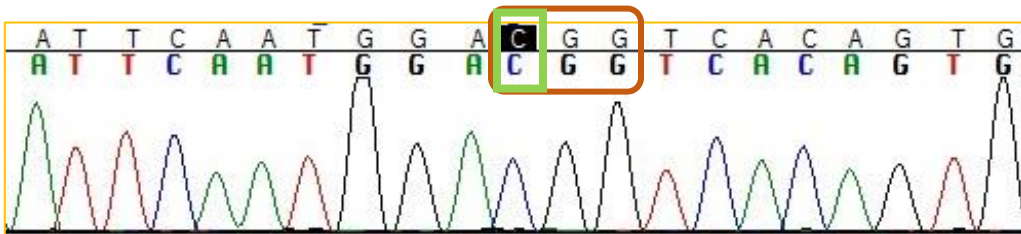


Figura 22: Resonancia magnética T2 de paciente masculino de 6 años de edad. Corte coronal de globo pálido, donde se visualiza el signo característico de “ojo del tigre”.

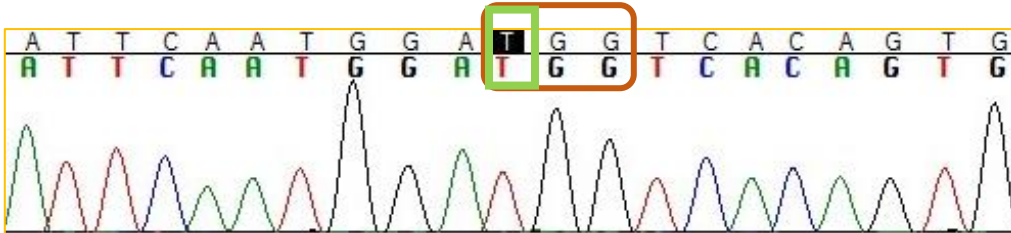
El segundo paciente presentó un cambio puntual en el codón 357 del exón 3, en la que se presenta una mutación de cambio de sentido, por el cambio del nucleótido citosina a timina, mismo que se confirmó con la secuencia antisentido por el cambio del nucleótido guanina a adenina, como se muestra en la Figura 23:

8.4.2 Paciente con PKAN atípica (Huntington-like) y la variante génica p.Arg357Trp

A)



B)



C)

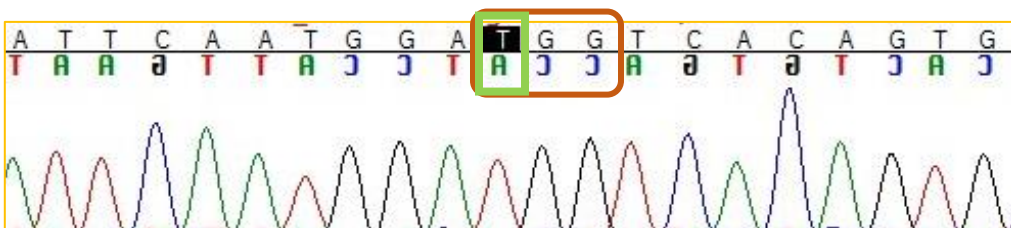


Figura 23: Electroferogramas parciales del exón 3 (PKAN atípica). A) Secuencia normal (alelo silvestre C), B) Secuencia sentido (cambio de C → T), C) Secuencia antisentido con la que se confirma la variante homocigota en el cambio de nucleótido (cambio de G → A). Provocando un cambio de aminoácido de Arginina a Triptófano.

La segunda variante identificada (p.Arg357Trp), se trató de un paciente masculino de 24 años de edad, los primeros síntomas que presentó fueron dificultades para escribir y hablar, movimientos distónicos en musculatura facial y en la lengua, alteraciones en las piernas a los 17 años de edad y con el paso del tiempo desarrolló alteraciones neurológicas consistentes con el síndrome pálido-piramidal con parkinsonismo, afectación de neurona motora superior y secuelas de necrosis vascular de cadera derecha, dificultad para hablar y para deglutir. Además de presentar alteraciones del sueño, caracterizadas por insomnio, así como ansiedad generalizada, dificultad para concentrarse y poner la mente en blanco, depresión, ideas de minusvalía y muerte (sin ideación suicida), ataques de pánico que se caracterizan por sudoración, sensación de opresión torácica, taquicardia, cefalea y mareo.



Figura 24: Resonancia magnética T2 de paciente masculino de 24 años. Corte axial de globo pálido, donde se visualiza el signo característico de "ojo de tigre".

8.5 Mutaciones identificadas.

En la tabla 8 se resumen las variantes génicas patológicas encontradas en el exón 3 del gen *PANK2* en los dos últimos pacientes analizados, así como su edad de inicio, el tipo de mutación y el cambio que se produce en el codón

Paciente	Género	Edad de inicio	Tipo de mutación	Mutación	Cambio en el codón	Cambio de aa	Cambio de nucleótido	Referencia
PANK2-101	Masculino	6 meses	Delección	p.Ser392fr	GTT→UAG	Val→ Stop	c. 1181/1182 AG/-	Rs778550409
PANK2-102	Masculino	17 años	Cambio de sentido	p.Arg357Trp	CGG→TGG	Arg→ Trp	c. 1075 C→T	Rs753376100

Tabla 9: Mutaciones identificadas en el gen *PANK2* en las muestras analizadas y características de los portadores.

Las mutaciones identificadas se encuentran reportadas en la base de datos de *Ensembl Genome Browser* y NCBI, en las que se confirma el diagnóstico de la enfermedad de Hallervoden Spatz.

La mutación p.Ser392fr que codifica para un codón de paro UAG, provoca que al no determinar ningún aminoácido de acuerdo al código genético, ya no se pueda unir un nuevo aminoácido, por lo que se libera el péptido al citosol, lo que puede genera una proteína trunca o incompleta.

La mutación p.Arg357Trp provoca el cambio de aminoácido de Arginina por Triptofano, estos aminoácidos tienen propiedades fisicoquímicas diferentes, en el caso del Trp es un aminoácido apolar, hidrofóbico y aromático y la Arg es un aminoácido polar con carga positiva, por lo que se considera de carácter básico. Estas diferencias en las propiedades de los aminoácidos pueden causar un cambio en la conformación de la proteína y una reducción o pérdida de su actividad.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La presencia de signos y síntomas de Huntington hizo evidente se realizara primero en este grupo de pacientes, el análisis molecular para determinar la presencia de alelos expandidos de huntingtina; sin embargo, en ellos se obtuvo un promedio de 19 repetidos CAG y un rango de 9-27 repetidos CAG; estos valores corresponden a alelos normales ya que para ser considerada mutación debe ser mayor a 40 repetidos, por lo que la prueba resulto negativa. Siendo necesario analizar otros genes de mayor frecuencia como son Huntington-like 2 o *JPH3* seguido de *TBP*, *PRNP*; al no obtener los resultados positivos, el estudio se continúa con genes relacionados a otras enfermedades como fue el caso de *PANK2*.

No se encontraron variantes génicas en 100 casos en los exones 2, 6 y 7, a pesar de que ya fueron descritas variantes en los exones 6 y 7 en la población mexicana en un estudio realizado por Pérez González et. al en 2013, mientras que las mutaciones en el exón 2 fueron descritas por Soudeh Ghafouri-Fard et. al en 2016. Como ya se mencionó anteriormente, se pone de manifiesto la necesidad de analizar los exones restantes para confirmar o no la participación del gen *PANK2*, y poder descartar la enfermedad de Hallervorden Spatz como una posible causa de enfermedad Huntington-like. En caso de que en el análisis completo del gen no se encuentren variantes, se deberá continuar el análisis con otros genes relacionados con los síntomas de la enfermedad de Huntington para poder realizar algoritmos clínicos.

De los 102 pacientes analizados, sólo dos presentaron mutaciones que fueron los últimos pacientes con fenotipo HDL en llegar al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, las mutaciones presentadas son p.Ser392fr y p.Arg357Trp. Ambas mutaciones ya reportadas en la India.^{86.87}

La mutación p.Ser392fs (Figura 25) encontrada en un caso infantil, el cual manifiesta la forma clásica de PKAN, pero al presentarse a muy temprana edad, los síntomas son más severos y rápidamente progresivos debido a una doble delección en el exón 3, lo que provoca se forme un codón de paro prematuro UAG, que al transcribirse dará como resultado una proteína truncada y posiblemente, al no tener la proteína pantotenato cinasa completa, ésta es degradada por el proteasoma, lo que produce que se acumule hierro en el cerebro y se pueda observar en la resonancia magnética la imagen típica de “ojo de tigre”.

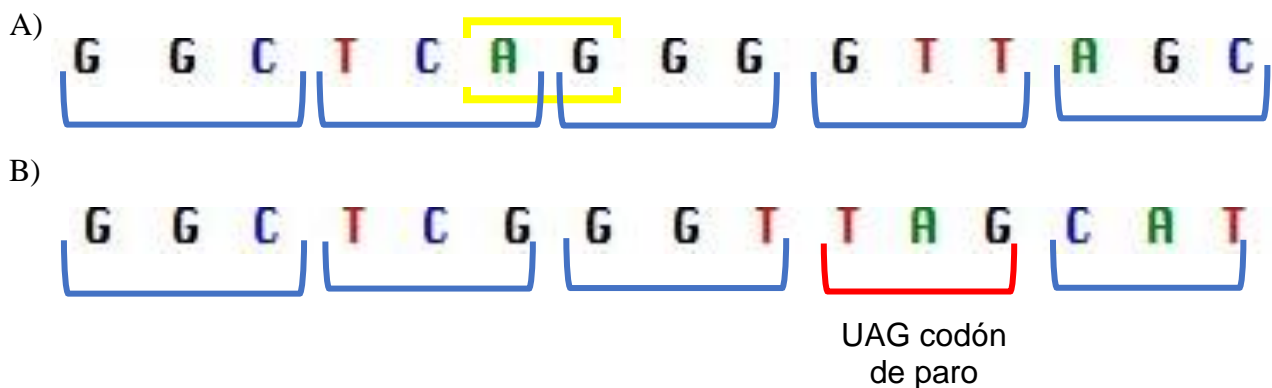


Figura 25: A) Segmento de la secuencia normal, B) Segmento de la secuencia del paciente donde se muestra el codón de paro que se forma al presentarse dos delecciones. En amarillo están seleccionadas los 2 nucleótidos eliminados.

Otros casos de pacientes con PKAN clásica que presentan mutaciones en el exón 3 han sido reportados, como es el caso de Sunil Gothwal y Swati Nayan (2016)⁸⁶, en donde presentan el caso de un niño de 8 años de edad con distonía retinopatía pigmentaria, pérdida de habilidades del desarrollo obtenidos previamente como la capacidad de sentarse y pararse, problemas para hablar, entre otras; además de presentar el signo del “ojo del tigre” en la resonancia magnética y tener padres consanguíneos. Los primeros síntomas los presentó a la edad de 4 años cuando presentó convulsiones. También presentó dos mutaciones, una en el exón 3 (Leu385CysfsX13) y otra en el exón 4 (p.Arg440Pro), lo que ocasionó que la proteína pantotenato cinasa tuviera una conformación diferente y, a pesar de que

no se sabe la función exacta de la proteína, al no tener la conformación adecuada, la proteína no lleva a cabo la fosforilación de la pantotenato a 4-fosfopantotenato, misma que es requerida para la biosíntesis de la CoA, y en consecuencia se presentará una acumulación de N-pantetonil-cisteína y cisteína libre, misma que puede quelar el hierro fisiológico, lo que provoca la acumulación de hierro y daño causado por las especies reactivas del oxígeno.

La mutación p.Arg357Trp presente en el paciente manifiesta la forma atípica de PKAN (Huntington-like), ya que la edad de inicio fue a los 17 años, con síntomas lentamente progresivos y de baja intensidad, presentó un cambio de nucleótido (**CGG→TGG**, Arg→Trp) en el exón 3, lo que origina que la proteína tenga un cambio conformacional, es decir, se pliega incorrectamente en la forma tridimensional, es por esto que la proteína no cumple con su función adecuadamente, lo que desencadena poco a poco la acumulación de hierro en el cerebro del paciente, como se mostró en la imagen por RM de este paciente.

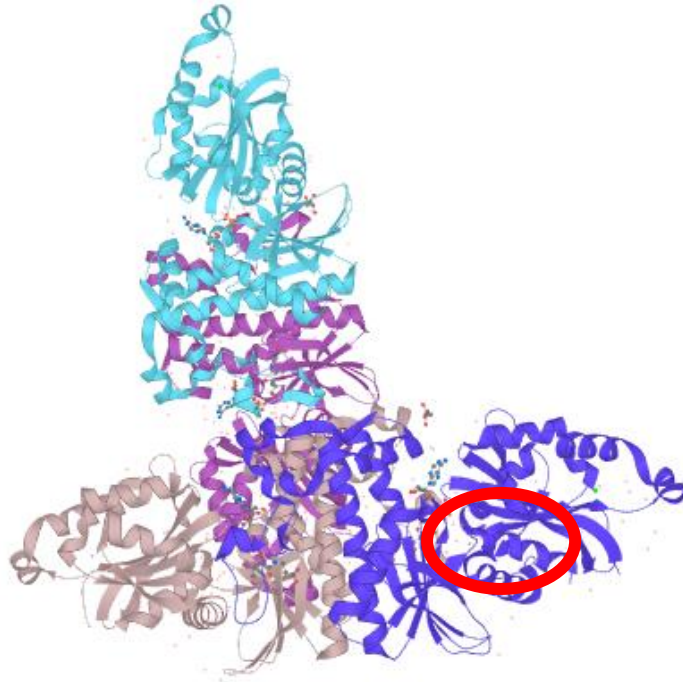


Figura 26: A) Fragmento de la secuencia normal, B) Fragmento de secuencia del paciente donde se observa el cambio de nucleótido de Citosina a Timina, lo que provoca el cambio en el aminoácido.

El paciente PANK2-102 tiene una presentación PKAN atípica con mutaciones en el exón 3 del gen *PANK2*, esta variante fue reportada por Arshia Angural, et al 2017⁸⁷, en donde se presenta el caso de una mujer de 25 años de edad con trastorno del movimiento extrapiramidal, distonía, marcha inestable espástica, disartria y dificultad para caminar y hablar entre otras. En la resonancia magnética se observa el signo característico del “ojo del tigre” además de tener padres consanguíneos portadores del gen mutado.

La paciente presentaba la mutación p.Arg357Trp (Figura 26) en estado homocigota en el exón 3, al igual que el paciente de nuestra serie, en ambos casos sugiere que la proteína tenga una conformación diferente afectando su función. En este artículo se menciona que el residuo R357 o Arg357 (Figura 27) puede ser esencial para la estabilidad del dominio catalítico de la pantotenato cinasa, por lo que la mutación p.Arg357Trp no favorece que se lleve a cabo la actividad de la cinasa, es por esto que la proteína no cumple su función normal y permite que se acumule hierro en la sustancia negra y el globo pálido.

A)



B)

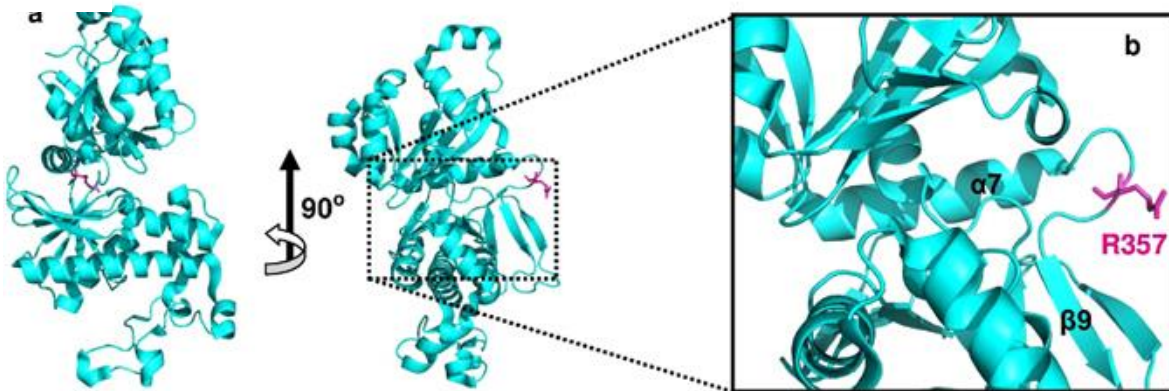


Figura 27: A) Estructura de la proteína pantotenato cinasa (en azul marino), se encuentra encerrado en un círculo rojo al área donde se encuentra el aminoácido R357. B) Fragmento de la pantotenato cinasa (azul marino) donde se observa el aminoácido R357 y donde, al haber un cambio en el aminoácido Arginina que está cargada positivamente, por Triptofano que es neutro, se cambia la estructura por repulsión de cargas y la proteína ya no fosforila adecuadamente.⁸⁷

Al no tener una base de datos en población mexicana donde se conozcan las incidencias de los diferentes padecimientos, es complicado saber el orden en el que se deben analizar los genes con base en los síntomas y signos que presenta. Por lo que incluir en el estudio a este gen a pesar de ser poco frecuente ayuda a establecer algoritmos clínicos que fortalecen el estudio de estos padecimientos, orientan al clínico a evaluar de acuerdo a los síntomas e iniciar el estudio molecular apropiado, realizando el análisis de los posibles genes que causan determinado fenotipo, lo que ahorra tiempo y reduce costos y hace oportuno el diagnóstico y la asesoría genética oportuna.

La importancia de este estudio es que permitirá el desarrollo de algoritmos clínicos, en donde se podrá indicar el orden en que deberán ser analizados los genes con base en los síntomas del paciente, así como la frecuencia en que éstos se presentan en nuestra población, lo que también permitirá conocer cómo se distribuyen con respecto a otras poblaciones.

10. CONCLUSIONES.

No se identificaron variaciones en ninguno de los primeros 100 pacientes a los que se les analizaron los exones 2, 6 y 7, esto puede deberse a que la variación genética está presente en los exones restantes o que la enfermedad Huntignton-like que padecen no es Hallervorden Spatz.

Se identificaron 2 variaciones en el exón 3 del gen PANK2, ambas variantes previamente reportadas en bases de datos. La variación p.Ser392fs que es una delección de los nucleótidos adenina y guanina provoca se forme un codón de paro prematuro UAG y la variante p.Arg357Trp, mutación puntual, que ocasiona un cambio del aminoácido Arginina al aminoácido Triptófano, que es un sitio crítico, lo que provoca que no se lleve a cabo la actividad de la cinasa.

11. ANEXO 1



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA "MVS" DEPTO. DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CONSENTIMIENTO INFORMADO PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

FECHA: ____/____/____

"Búsqueda de asociación entre manifestaciones clínicas de fenocopias de la enfermedad de Huntington y mutaciones en los genes *TBP, ATN1, JPH3, PRNP, FTL, ATXN1, ATXN2, ATXN3, FXN, PANK2 y C9ORF72*

1. He sido informado/a que en el departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se está realizando una investigación para saber si los pacientes negativos al estudio molecular de enfermedad de Huntington (EH), pueden tener mutaciones en otros genes causales de su cuadro clínico.
2. Las evaluaciones a realizar en el presente proyecto son: *escala unificada de rangos para enfermedad de Huntington (UHDRS)*, así como toma de muestra de sangre periférica para la evaluación de los genes *TBP, ATN1, JPH3, PRNP, FTL, ATXN1, ATXN2, ATXN3, FXN, PANK2 y C9ORF72*.
3. He sido informado/a que si acepto participar en este estudio se me tomará una muestra de sangre periférica de 10 ml., de la cual se extraerá mi DNA que es el material hereditario con la finalidad de evaluar los genes antes mencionados y que se conocen como generadores de un cuadro clínico similar a la EH.
4. He sido informado/a que mi participación en el estudio es **VOLUNTARIA** y que si no acepto participar, no se afectará mi tratamiento y seguimiento en el Instituto.
5. He sido informado/a que mi participación en el estudio no representa ningún costo para mí.
6. He sido informado/a que no recibiré remuneración económica por participar en este estudio
7. He sido informado/a que puedo abandonar el estudio en el momento que yo lo desee.
8. He sido informado que mi DNA se usará para esta investigación y para otras en las que se están analizando genes de la población mexicana.
9. He leído esta carta cuidadosamente y he decidido participar libre y voluntariamente en el estudio.
10. Para cualquier duda o aclaración sobre este estudio puede comunicarse con las personas responsables de esta investigación el Dr. Miguel Ángel Ramírez García y la Dra. Petra Yescas G. al teléfono 56 06 38 22 Ext. 2018 ó 2002, respectivamente. También se puede dirigir con el Dr. Antonio Torres Ruíz, presidente del Comité de Bioética de nuestro Instituto a la extensión 5027.

Nombre del paciente ó familiar _____

Dirección _____

Teléfono _____

Responsable legal _____ Firma _____

Parentesco _____

Nombre y firma del 1er. testigo

Nombre y firma del 2º testigo

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento

Firma _____

12. BIBLIOGRAFIA:

1. Bhattacharyya Kalyan B., *The story of George Huntington and his disease* Annals of Indian Academy of Neurology, Official Journal of Indian Academy of Neurology, 2016; 19(1): 25–28
2. Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M., Naylor S.L., Anderson M.A., Tanzi R.E., Watkins P.C., Ottina K., Wallace M.R., Sakaguchi A.Y., et al. *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*, Nature Genetics, 1983; 17-23; 306(5940): 234-238
3. Conneally Michael P., Wallace Margaret R., Gusella James F., Wexler Nancy S., *Huntington disease: Estimation of heterozygote status using linked genetic markers*, Genetic Epidemiology, 1984; 1(1):81-88
4. Almaguer Mederos Luis Enrique, Cuello Almarales Dany, González Zaldivar Yanetza, Martínez Góngora Edilberto, Paneque Herrera Milena, *Biología molecular de la enfermedad de Huntington*, Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias “Carlos J. Finlay”. Departamento de Neurobiología Molecular, Correo Científico Médico de Holguin, 2017; 11(4)4
5. NIH U.S. National Library of Medicine, HTT gene huntingtin, Genetics Home Reference, 2019. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HTT#conditions>)
6. Juan Solari Alberto, *Genética Humana Fundamentos y Aplicaciones en Medicina 3ª Edición*, Ed. Panamericana, 2004, pág: 195-204
7. Huntington's Disease Society of America HDYO, *El gen de la Enfermedad de Huntington: Bajo el microscopio*, Inglaterra. (<https://es.hdyo.org/eve/articles/50-es.pdf>)
8. Novo Villaverde Francisco Javier, *Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina*, Editorial Pearson Educación, 2001, pag. 199
9. NIH National Institute of Neurological Disorders and Stroke, *Enfermedad de Huntington: esperanza a través de la investigación*, 2016. (https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/Enfermedad_de_Huntington.htm)
10. Ghafouri-Fard Soudeh, Reza Yassaee Vahid, Rezayi Alireza, Hashemi-Gorji, Feyzollah, Alipour Nasrin, Miryounesi Mohammad, *A Novel Nonsense Mutation in PANK2 Gene in Two Patients with Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration*, International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 2016; 5(4):255-259
11. Passarge Eberhard, *Genética: Texto y Atlas 3ª Edición*, Ed. Panamericana, 2004, págs. 208-272

12. Rosales-Reynosa Mónica A., Barros-Núñez Patricio, *Diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington*, Gac Med Méx, 2008; 144 (3)
13. <http://omim.org/entry/143100#molecularGenetics>
14. Raymund Roos, *Enfermedad de Huntington Juvenil*, Orphanet, Rare Diseases 360, 2018, OMIM: 143100
15. Cuenca Patricia, Morales Fernando, *Las mutaciones inestables, nuevo reto para el consejo genético de enfermedades hereditarias*, Biología Tropical, 2004, vol. 52 n.3, ISSN 0034-7744
16. Martínez A., Rábano, A., *Anatomía patológica de la enfermedad de Huntington*, Revista Española de Patología, 2002, Vol. 35, n°4
17. Di Maio L, Squitieri F, Napolitano G, Capanella G, Trofetter JA, Conneally PM, *Suicide risk in Huntington's disease*, Journal of Medical Genetics, 1993, 30(4): 293-295
18. Mayo Clinic, *Enfermedad de Huntington*, 2017 (<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/huntingtons-disease/symptoms-causes/syc-20356117>)
19. Figueroba Alex, *Corea de Huntington: causas, síntomas, fases y tratamiento*, Psicología y Mente
20. Sagan Carl, *Enfermedades hereditarias I: Corea de Huntington o mal de San Vito*, La Ciencia y sus demonios, 2013; 218–28
21. Women's health & Wellness, *Prueba presintomática para la enfermedad de Huntington*, National Institutes of Health, 2000
22. Jürgen Andrich, Epplen Jörg T., *Enfermedad de Huntington, Mente y Cerebro*, 6ª edición, Ed. Feterman, 2006, págs. 78-82.
23. Gómez Naranjo Heidy, Espinosa García Eugenia, Paredes Ángeles, *Déficit de pantotenato quinasa asociado a neurodegeneración: Reporte de un caso clásico y revisión de la literatura*, 2015; 319-324
24. Wild EJ, Mudanohwo EE, Sweeney MG, et al. *Huntington's disease phenocopies are clinically and genetically heterogeneous*. Mov Disord, 2008;23:716-720
25. Schneider Susanne A., Bird Thomas, *Huntington's disease, look-alike and hereditary chorea, whats new?*, International Parkinson and movement

disorder society, 2016; 342-354

26. Santos García Diego, *Imitadores de la enfermedad de Huntington: síndromes Huntington-like y otras fenocopias*, Sección de Neurología, Hospital A. Mercide, 2011, Vol. 3, n°1
27. NIH, U.S. National Library of Medicine, *Huntington disease-like syndrome*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/huntington-disease-like-syndrome>)
28. NIH, U.S. National Library of Medicine, *PRNP gene prion protein*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PRNP>)
29. NIH, U.S. National Library of Medicine, *JPH3 gene junctophilin 3*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/JPH3>)
30. NIH, U.S. National Library of Medicine, *TBP gene TATA-box binding protein*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TBP>)
31. NIH, U.S. National Library of Medicine, *ATXN1 gene ataxin 1*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATXN1>)
32. NIH, U.S. National Library of Medicine, *ATXN2 gene ataxin 2*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATXN2>)
33. NIH, U.S. National Library of Medicine, *ATXN3 gene ataxin 3*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATXN3>)
34. NIH, U.S. National Library of Medicine, *FXN gene frataxin*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FXN>)
35. NIH, U.S. National Library of Medicine, *C9orf72 gene chromosome 9 open reading frame 72*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/C9orf72>)
36. NIH, U.S. National Library of Medicine, *PANK2 gene pantothenate kinase 2*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PANK2>)
37. Burgos Javier S., *Las inquietantes investigaciones del Dr. Hallervorden*, Jot Down contemporary culture mag, 2014
38. <https://www.t4-denkmal.de/eng/Julius-Hallervorden>
39. ENACH, Asociación de enfermedades neurodegenerativas por Acumulación Cerebral de Hierro (Hallervorden-Spatz), 2013, CIE-10: G23.0

40. Hurtado, P., Salvador, L., Carrero, E., Rumia, J., Fábregas, N., *Consideraciones anestésicas en una paciente con déficit de pantotenato cinasa tipo 2 (enfermedad de Hallervorden-Spatz) para estimulación cerebral profunda*, Revista Española de Anestesiología y Reanimación, 2009; vol. 56, núm. 3, 135-201.
41. Instituto Internacional de la Melatonina, *¿Qué es estrés oxidativo?*, 2017; Vol. 21, nº1 1560-4381. (<https://iimel.es/11-que-es-la-melatonina/54-que-es-el-estres-oxidativo>)
42. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D., *Metal, Toxicity and Oxidative Stress*, Current Medicinal Chemistry, 2005; 12 (10): 1161-208
43. https://www.coenzima.com/coenzima_a_coa
44. Biopsicologia.net, Biología y Salud Metal, 6.7. Acetil-CoA, 2012
45. <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/33083>
46. <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/acido-pantotenico>
47. Aza Valencia Lisbeth S., Canaza Palomino Lesli, Parillo Gutiérrez Ivan, Baylor Hidalgo Luis R., *Los aminoácidos en la industria alimentaria*, 2014
48. EcuRed *Cisteína*, Conocimiento con todos y para todos, mayo 2018; 197-255
49. <https://quosalud.com/hierro>
50. Bello Abel, *Consecuencias funcionales de la deficiencia del hierro*, Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 2004; 61(1):1-3
51. García Hernández Yenela, González Hernández Raúl, González Pérez Maritza, Aznar García Elisa, *Desarrollo neural y deficiencia de hierro*, 2005; ISSN: 0253-5688
52. Gratacós Marcel, *Ganglios Basales: Funciones, Anatomía y Patologías*, 2008. (<https://www.lifeder.com/ganglios-basales/>)
53. Sant Joan de Déu, *Enfermedades Neurodegenerativas con Acúmulo Cerebral de Hierro (ENACH)*, Hospital Materno infantil – Universitat de Barcelona, 2015. (<https://metabolicas.sjdhospitalbarcelona.org/ecm/enfermedades-neurodegenerativas-acumulo-cerebral-hierro-enach>)
54. NIH National Center for Advancing Translational Sciences, *Neurodegeneración asociada a pantotenato-quinasa*, GARD Genetic and

Rare Diseases Information Center, 2017.
(<https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/13323/neurodegeneracion-asociada-a-pantotenato-quinasa>)

55. Bing Zhou, Shawn K. Westaway, Barbara Levinson, Monique A. Johnson, Jane Gitschier, Susan J. Hayflick, *A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome*, Nature Genetics 28, 2001, 345-349.
56. NIH, U.S. National Library of Medicine, *PLA2G6 gene phospholipase A2 group VI*, Genetics Home Reference, 2018.
(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PLA2G6>)
57. Morgan NV, Westaway SK, Morton JE, Gregory A, Gissen P, Sonek S, Cangui H, Coryell J, Canham N, Nardocci N, Zorzi G, Pasha S, Rodriguez D, Desguerre I, Mubaidin A, Bertini E, Trembath RC, Simonati A, Schanen C, Johnson CA, Levinson B, Woods CG, Wilmot B, Kramer P, Gitschier J, Maher ER, Hayflick SJ, *PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with brain iron*, Nature Genetics, 2007, 38(7): 752–754.
58. NIH, U.S. National Library of Medicine, *C19orf12 gene chromosome 19 open reading frame 12*, Genetics Home Reference, 2018.
(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/C19orf12>)
59. Harting MB, Iuso A, Haack T, Kmiec T, Jurkiewicz E, Heim K, Roeber S, Tarabin V, Dusi S, Krajewska-Walasek M, Jozwiak S, Hempel M, Winkelmann J, Elstner M, Oexle K, Klopstock T, Mueller-Ferber W, Gasser T, Trenkwalder C, Tiranti V, Kretzschmar H, Schmitz G, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, *Absence of an orphan mitochondrial protein, c19orf12, causes a distinct clinical subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation*, American journal of human genetics, 2011, 89(4):543-50
60. NIH, U.S. National Library of Medicine, *FA2H gene fatty acid 2-hydroxylase*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FA2H>)
61. Kruer MC, Paisán-Riuz C, Boddart N, Yoon MY, Gregory A, Malandrini A, Woltjer RL, Munnich A, Gobin S, Polster B, Palmeri S, Edvardson S, Hardy J, Houlden H, Hayflick SJ, *Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA)*, Annals of neurology, 2010, 68(5):611-8
62. NIH, U.S. National Library of Medicine, *ATP13A2 gene ATPase cation transporting 13A2*, Genetics Home Reference, 2018.
(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATP13A2>)

63. Susanne A. Schneider, Coro Paisan-Ruiz, Niall P. Quinn, Andrew j. Lees, Henry Hbonoulder, John Hardy, Kailash P. Bhatia, *Atp13a2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation*, *Movement Disorders*, 2010, volumen 25, issue 8 pag. 979-984.
64. NIH, U.S. National Library of Medicine, *WDR45 gene WD repeat domain 45*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/WDR45>)
65. Anne Tschentscher, Gabriele Dekomien, Sophia Ross, Kirsten Cremer, Guido M. Kukuk, Jörg T. Epplen, Sabine Hoffjan, *Analysis of the C19orf12 and WDR45 genes in patients with neurodegeneration with brains iron accumulation*, 2015, volume 349, issues 1-2, pags 105-109.
66. NIH, U.S. National Library of Medicine, *COASY gene Coenzyme A synthase*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/COASY>)
67. Sabrina Dusi, Lorella Valletta, Tobias B. Haack, Yugo Tsuchiya, Paola Venco, Sebastiano Pasqualato, Paola Goffrini, Marco Tigano, Nikita Demchenko, Thomas Wieland, Thomas Schwarzmayr, Tim M. Strom, Federica Invernizzi, Barbara Garavaglia, Allison Gregory, Lynn Sanford, Jeffrey Hamada, Valeria Tiranti, *Exom Sequence Reveals Mutations in CoA Synthase as a Cause of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*, *African Journal of History and Culture*, 2014, volume 94, issue 1-2, pag 11-22.
68. NIH, U.S. National Library of Medicine, *FTL gene ferritin light chain*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FTL>)
69. R. Vidal, B Ghetti, M. Takao, Brefel-Coubon, E. Uro- Coste, B. S. Glazier, V. Siani, M.d. Benson, P. Calvas, L. Miravalle, O. Rascol, M.B. Delisle, *Intracellular Ferritin Accumulation in Neural and Extraneural Tissue Characterizes a Neurodegenerative Disease Associated with a Mutation in the Ferritin Light Polypeptide Gene*, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2004, volumen 63, issue 4, pag 363-380.
70. NIH, U.S. National Library of Medicine, *CP gene ceruloplasmin*, Genetics Home Reference, 2018. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CP>)
71. Z. Leah Harris, Alison P. Durley, Tsz Kwong Man, Jonathan D. Gitlin, *Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in celular iron efflux*, *PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96 (19) 10812-10817
72. NIH, U.S. National Library of Medicine, *DCAF17 gene DDB1 and CUL4 associated factor 17*, Genetics Home Reference, 2018.

(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DCAF17>)

73. C.E. Arber, A. Li, H. Houlden, S. Wray, *Insights into molecular mechanisms of disease in neurodegeneration with brain iron accumulation: unifying theories*, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, volumen 42, issue 3, 2015
74. Pérez González A.E., Chacón Camacho O.F., Arteaga Vázquez J., Zenteno J.C., Mutchinick O.M., *A novel gene mutation in PANK2 in a patient with an atypical form of pantothenate kinase-associated neurodegeneration*, *European Journal of Medical Genetics*, 2013; 56(11): 606-8
75. Citogen Centro de Análisis Genéticos, *Consanguinidad y Riesgo de Enfermedades Hereditarias en la Descendencia*, 2014
76. Gregory Allison, Hayflick Susan, *Neurodegeneration with brain iron accumulation type 1*, *The American Journal of Pathology*, 2010; ICD-10: G23.0
77. Sauri Suárez Sergio, García Silvia, Álvarez Nuño Samuel, Venegas Torres Andrés, Pla Casamitjana Carlos Ferrán, González Bustamante González Dalia, *Síndrome extrapiramidal progresivo ¿enfermedad de Hallervorden Spatz? Comunicación de un caso y revisión de la bibliografía*, *Revista Medicina Interna de México*, 2017; 177-181
78. Estrada-Juárez Higinio, Fernández-Hernández Liliana, Rivera-Pedroza Carlos, Grether-González Patricia, *MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligados múltiples) en el diagnóstico perinatal rápido de las principales aneuploidías*, *Perinatología y Reproducción humana*, 2012, vol. 26, n°3
79. Del Valle López Pilar, Pérez García Rosa, Sanguino Andrés Rosa, González Pablos Emilio, *Adult onset Hallervorden-Spatz disease with psychotic symptoms*, *Actas Españolas de Psiquiatría*, 2011; 39(4):260-2
80. Forrellat Barrios Mariela, Gautier Du Défaix Gómez Hortensia, Fernández Delgado Norma, *Metabolismo del hierro*, Instituto de hematología e inmunología, *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 2000; ISSN 0864-0289, 1561-2996
81. Sánchez C., Torres K., Vázquez A., Márquez L., Villalobos R., Rodríguez I., *Case Report of Hallervorden-Spatz Disease*, *Med Int Mex*, 2003; 23:177-81
82. Mejía Mariela, *Enfermedades raras: cuando tu caso es uno entre miles*, *Diario Libre*, 2015. (<https://www.diariolibre.com/actualidad/enfermedades-raras-cuando-tu-caso-es-uno-entre-miles-GADL1006891>)

83. Achar Víctor, Zenteno Juan Carlos, *Actualidades en el tratamiento de la retinosis pigmentaria*, *Rev Mex Oftalmol*, 2008, 82(5):309-313
84. Garg J. Sunir, *Retinitis pigmentosa*, The retina Service of Wills Eye Hospital, Manual MSD. (<https://www.msmanuals.com/es-ec/hogar/trastornos-oft%C3%A1lmicos/trastornos-de-la-retina/retinitis-pigmentosa>)
85. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*, *Nucleic Acids Research*, 1988; 16(3): 1215
86. Sunil Gothwal, Swati Nayan, *Hallervorden-Spatz Syndrome with Seizures*, *Basci and Clinical Neuroscience*, 2016, 7(2):165-166
87. Angural Arshia, Singh Inderpal, Mahajan Ankit, Pandoh Pranav, Dhar Manoj K., Kaul Sanjana, Verma Vijesh, Rai Exta, Rasdazn Sushil, Pandita Kamal K., Sharma Swarkar, *A variation in PANK2 gene is causing Pantothenate Kinase- associated Neurodegeneration in a family from Jammu and Kashmir – India*, *Scientific Reports*, 2017, DOI: 10.1038/s41598-017-05388-9
88. Rafael Fermin Delgado, Pedro Roa Sanchez. Herwin Speckter, Eddy Perez Then, Ramney Jimenez, Jairo Oviedo, Paulo R. Dellani, Bernd Foerster, Peter Stoeter, *Missense PANK2 mutation without “Eye of the tiger” sign: MR findings in a large group of patients with pantothenate kinase- associated neurodegeneration (PKAN)*, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2012, volume 35, issue 4, pags 788-794.
89. Shi Xulai, Zheng Feixia, Ye Xiuyun, Li Xiucui, Zhao Qianlei, Lin Zhongdong, Hu Ying, Wang Jiwen, *Basal ganglia calcification and novel compound heterozygous mutations in the PANK2 gene in a Chinese boy with classic Pantothenate kinase- associated neurodegeneration*, *Medicine (Baltimore)*, 2018; DOI:10.1097/MD.00000000000010316.
90. Rodríguez Pupo Jorge M., Díaz Rojas Yuna V., Rojas Rodríguez Yesenia, Rodríguez Batista Yordanis, Nuñez Arias Enriqueta, *Update on Huntington Disease*, *Correo Científico Médico de Holguin*, 2013; vol. 17, supl. 1, 1560-4381
91. Evans Joanne, *Cursos Crash: Lo esencial en célula y genética*, 3ª Edición, Ed. Elsevier Mosby, España, 2011, pág 162 Hurtado, P., Salvador, L., Carrero, E., Rumia, J., Fábregas, N., *Consideraciones anestésicas en una paciente con déficit de pantotenato cinasa tipo 2 (enfermedad de Hallervorden-Spatz) para estimulación cerebral profunda*, *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 2009; vol. 56, núm. 3, 135-201

92. Rosales-Reynoso Mónica A., Ochoa-Hernández A. B., Barros-Núñez Patricio. *Enfermedades causadas por expansión de tripletes*, Rev Neurol, 2009; 49:79-87
93. Douglas Andrew G. L., Wood Matthew J. A., *RNA splicing: disease and therapy*, OXFORD Academic, Briefings in Functional Genomics, mayo, 2011; vol 10, no.3, 161-164
94. García Romero Alejandro, *Enfermedad de Huntington: síntomas neuropsicológicos*, Psicología y conducta, 2016.
(<http://www.psicologiayconducta.com/enfermedad-de-huntington-sintomas>)
95. García Hernández Yenela, González Hernández Raúl, González Pérez Maritza, Aznar García Elisa, *Desarrollo neural y deficiencia de hierro*, Revista CENIC Ciencia Biológicas, 2005; vol. 36 ISSN: 0253-5688
96. Gálvez M., Marcelo Farías A., Mauricio Asahi K., Takeshi, Bravo C. Eduardo, *Cálculo de tiempos T1 y T2 in vitro*, Revista Chilena de Radiología, 2005, vol. 11, no.3, págs. 109-115.
97. Paraskevas George P., Yapijakis Christos, Bougea Anastasia, Constantinides Vasilios, Bourboulis Mara, Stamboulis Eleftherios, KAPAKI, Elisabeth, *Novel PANK2 mutation in the first Greek compound heterozygote patient with pantothenate-kinase-associated neurodegeneration*, SAGE Open Medical Case Reports, 2017; DOI:10.1177/2050313X17720101
98. Álvarez-Cordoba, Mónica, Fernández Khoury, Aida, Villanueva-Paz, Marina, Gómez-Navarro, Carmen, Villalón-García, Irene, Suárez –Rivero, Juan M, Povea-Cabello, Suleva, de la Mata, Mario, Cotán, David, Talaverón-Rey, Marta, Pérez-Pulido, Antonio J, Salas, Joaquín J, Pérez-Villegas, Eva, Díaz-Quintana, Antonio, Armengol, José A., Sánchez-Alcázar, José A., *Pantothenate Rescues Iron Accumulation in Pantothenate Kinase-associated Neurodegeneration Depending on the Type of Mutation*, Molecular Neurobiology, 2018, DOI:10.1007/s12035-018-1333-0