



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**  
**Carrera de Biología**

**Búsqueda de mutaciones en los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*,  
*ATN1* y *FTL* en pacientes mexicanos con fenotipo de  
Enfermedad de Huntington.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
**BIÓLOGO**

Presenta:  
**Jorge Luis Sánchez Torres**

**Directora de tesis: Dra. Petra Yescas Gómez.**



Tlalnepantla, Edo. de Méx. a Enero de 2015.



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.

***“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas,  
ahora sabemos que está en nuestros genes”.***

**- James Watson -**



El presente trabajo fue desarrollado en el departamento de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

---

Dra. Petra Yescas Gómez.

**Directora de tesis.**

---

Jorge Luis Sánchez Torres.

**Sustentante.**

## *Dedicatoria.*

En filosofía se califica toda aquella actividad como eminente a un ser cuando la acción perdura en su interior, cuando tiene su fin en ese mismo ser. Bajo esa premisa esta tesis está dedicada a la memoria de Jorge Sánchez Romero: Una gran persona, un hombre ejemplar, pero sobre todo, EL MEJOR ABUELO DEL MUNDO.

## *Agradecimientos.*

A mi Padre, Sr. Agustín Sánchez Espinosa: Por ser siempre mi héroe, porque siempre pones el corazón en todo lo que haces, porque desde hace mucho tiempo no dejas de sorprenderme con todo lo que sabes y porque espero lograr que algún día sea al revés. Por enseñarme a siempre luchar y a nunca decir “no puedo”. Gracias por dejarme encontrar en ti a mí mejor amigo.

A mi Madre, Sra. Blanca Elena Torres Castro: Por toda tu dulzura, tiempo, paciencia y dedicación, por todas esas noches de desvelo a mi lado, por ser la persona más fuerte que conozco y por tener siempre para cada problema una solución. Gracias por todos tus consejos, cariño y palabras de aliento cuando más lo necesito.

A mi hermana, Biól. Irais Magalli Sánchez Torres: Gracias por ser siempre mi mejor amiga, por convertirme en tu héroe aunque a veces no lo merezca, por estar siempre a mi lado en buenas y malas. No me canso de expresar lo orgulloso que estoy de ti y doy gracias por lo afortunado que soy al tener una hermana como tú. Siempre estaré para ti mi pequeña Rotífera.

A mi hermano, Erick Daniel Sánchez Torres: Gracias por ser siempre compañero de mi vida, por tus palabras de aliento y por el apoyo incondicional que me brindas, porque a pesar de las diferencias siempre hemos estado ahí el uno para el otro, gracias por compartirme tu manera de ver la vida.

A mi abuelita, Sra. Socorro Espinoza Delgadillo: Por todo tu cariño y amor, por enseñarme a siempre dar lo mejor de mí, por tus consejos llenos de sabiduría y por la fuerza que me transmites cuando más lo necesito.

### **A mis tíos.**

A Rodolfo y Rocío: Por todo el apoyo que me han brindado todos estos años y por enseñarme a siempre hacer mi trabajo con entrega y dedicación. Gracias por su ejemplo.

A Marco y Ale: Gracias porque nunca dudaron de mí capacidad y siempre me incentivaron a seguir adelante, gracias por sus consejos y su forma tan especial de hacerme sentir bien en las peores circunstancias, gracias porque sin saberlo me han enseñado mucho.

A Mauricio y Angélica: Muchas gracias por siempre estar al pendiente de mí, por todas sus enseñanzas y porque de no ser por sus consejos yo no estaría en la *Máxima Casa de Estudios*.

A Helen: Con la mayor gratitud por toda tu dulzura, cariño y paciencia. Por mostrarme que el amor de una tía es tan profundo como el de una madre.

A mis tíos, Edgardo, Laura, Gabriela y Erick: Por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación, porque con su apoyo y aliento he logrado uno de mis más grandes anhelos.

A mis tíos José Alfredo Vela y María Esther Sánchez: Por todo el cariño y dedicación que tuvieron conmigo, con mi familia y con mi carrera, pero sobre todo por inculcarme su amor a la ciencia y enseñarme a siempre luchar por lo que quiero.

### **A mis primos.**

Víctor, Miguel, Manuel, Ariana y Georgina: Por todos los momentos a su lado, por esas travesuras y charlas interminables que hemos tenido. Por estar siempre conmigo aunque a veces mi humor no sea el adecuado. También porque siempre dibujan una sonrisa en mi rostro aunque la situación sea difícil. Gracias por ser los mejores amigos que he tenido.

### **A mis amigos.**

A Nancy: Gracias por todo lo que hemos pasado juntos, por acompañarme en alegrías y tristezas, por ser siempre mi ATP; pero sobre todo por aguantarme en mis ratos de estrés.

A Juan, Lorena, Jazmín, Karina y Susana: Por esos ratos inolvidables a su lado, por su apoyo incondicional, por todo lo que me han enseñado y por haber llegado a mi vida en el momento preciso.

A mis amigos del laboratorio de Neurogenética del INNN. Osvaldo, Allan, Alberto, David, Marisol, Omar, Silvestre y Edgar: Gracias por todo el apoyo que me brindaron y por las palabras de aliento que me daban cuando más lo necesitaba. Gracias por hacer inolvidable mi estancia en el laboratorio.

A Catherine: Por tu gran amistad, por todos tus consejos, por tu apoyo en la parte clínica de este proyecto y por incentivarme a siempre ir por más.

A Ingrid: Por brindarme tu invaluable amistad, por reír y llorar conmigo, por todos tus consejos, enseñanzas y palabras llenas de sabiduría; gracias porque me brindaste el privilegio de poder llamarte amiga.

### **A mis maestros.**

A mi tutora, Dra. Petra Yescas Gómez: Por darme la confianza y la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Por compartirme su entusiasmo, entrega y dedicación con la genética. Por todo su apoyo y palabras de aliento, y porque a pesar de tener mil cosas en la mente siempre tenía tiempo para aclarar alguna de mis tantas dudas.

A la M. en C. Lizbeth Esmeralda García Velázquez: Por toda tu ayuda durante mi proyecto, por convertirte en mi mentora y por tu inmensa paciencia al enseñarme parte de lo mucho que sabes. También por enseñarme que siempre se pueden mejorar las cosas, aunque el proceso para esto a menudo no es fácil.

A la Dra. Nancy Monroy Jaramillo: Por todas sus enseñanzas y comentarios constructivos en pro de mi formación. Por brindarme la confianza para poder acercarme a usted. Mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Margarita Canales Martínez: Por todas las atenciones que tuvo conmigo durante mi estadía en Iztacala, por su asesoría durante mi investigación en farmacognosia y por tenderme la mano siempre que necesite ayuda.

A mis sinodales, Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, Dra. Marissa Calderón Torres, Dr. Elías Piedra Ibarra: Por todas sus observaciones, comentarios y sugerencias para este trabajo. También por todos los conocimientos transmitidos en sus clases.

Al Dr. Sergio González Moreno (†), Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado, M. en C. Josefina Vázquez Medrano, M. en C. Norma Laura García Saldivar, Biól. Felipe de Jesús Cruz López, Biól. Asela del Carmen Rodríguez Varela, Biól. Arnulfo Reyes Mata, Biól. Guadalupe Villanueva Santiago: Por todos los conocimientos aprendidos en sus aulas y por la pasión que transmitían en sus clases, gracias por ser los mejores pilares en mi conocimiento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México: Por otorgarme el honor de pertenecer a su comunidad y por permitirme tener educación superior de un altísimo nivel.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala: Por otorgarme todas las herramientas necesarias para mi formación y por ser más que mi segundo hogar durante varios años.

Al Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez": Por todos los conocimientos adquiridos y por permitirme dar un paso más para alcanzar mi sueño a nivel profesional.

A todas las demás personas que nombrarlas sería interminable pero que siempre estuvieron a mi lado apoyándome. **¡A todos Mil Gracias!**

# Índice

Glosario.....	1
Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
1.1...Enfermedades Neurodegenerativas.....	4
1.2...Enfermedad de Huntington (EH).....	5
1.2.1...Características clínicas de la EH.....	5
1.2.2...Características neuropatológicas de la EH.....	8
1.2.3...Características genéticas de la EH.....	9
1.2.4...Prevalencia de la EH.....	13
1.3...Enfermedades Huntington- <i>like</i> (HDL).....	13
1.4...HDL1.....	15
1.5...HDL2.....	16
1.6...HDL3.....	17
1.7...HDL4/SCA17.....	18
1.8...Atrofia dentatorubro-pálidoluisiana.....	19
1.9...Neuroferritinopatía.....	20
2. Antecedentes.....	22
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos.....	25
6. Material y métodos.....	26
7. Resultados.....	40
8. Discusión.....	52
9. Conclusiones.....	56
10. Bibliografía.....	57
Apéndice 1.....	63
Apéndice 2.....	65

# Glosario

**Acinesia:** Incapacidad para iniciar un movimiento cuando este movimiento es preciso.

**Apraxia:** Pérdida de la capacidad de llevar a cabo movimientos de propósito, aprendidos y familiares, a pesar de tener la capacidad física (tono muscular y coordinación) y el deseo de realizarlos.

**Astroglíosis:** Proliferación de astrocitos en regiones lesionadas del sistema nervioso central y que por lo general deja como saldo la formación de una cicatriz glial.

**Ataxia:** Trastorno caracterizado por la disminución de la capacidad de coordinar los movimientos.

**Bradicinesia:** Trastorno caracterizado por una disminución en la velocidad de los movimientos normales y una escasez de los mismos, así como por una incapacidad para iniciar y desarrollar movimientos con una velocidad normal.

**Coreoatetosis:** Síndrome que se caracteriza por la presencia de movimientos incontrolados e involuntarios en varias zonas corporales, con carácter de atetosis (posturas retorcidas, proximales y frecuentemente alternantes) y de corea (movimientos involuntarios, breves y finalidad aparente, especialmente de la cara y las extremidades distales).

**Demencia:** Síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria.

**Disartria:** Trastorno de la programación del habla. Los músculos de la boca, la cara y el sistema respiratorio se pueden debilitar, moverse con lentitud o no moverse en absoluto.

**Disfagia:** Dificultad para la deglución.

**Distonía:** Trastorno del movimiento que causa contracciones involuntarias de los músculos. Estas contracciones resultan en torsiones y movimientos repetitivos. Algunas veces son dolorosos.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**Espongiosis:** Anormalidad histológica que consiste en la aparición de pequeñas vacuolas en el citoplasma de las células.

**Heterogeneidad de *locus*:** Situación en que las mutaciones producidas en genes que se encuentran en diferentes *loci* cromosómicos dan lugar al mismo fenotipo.

**Hipercinesia:** Aumento exagerado de la actividad y de la amplitud de los movimientos musculares involuntarios.

**Hiperreflexia:** Reacción del sistema nervioso autónomo a la estimulación excesiva. Dicha reacción puede incluir hipertensión arterial, cambio en la frecuencia cardíaca, cambios de color de la piel y sudoración excesiva.

**Hipocinesia:** Trastorno de la movilidad que consiste en una disminución y lentificación de los movimientos voluntarios.

**Mioclonía:** Movimientos involuntarios, breves, bruscos y repentinos, a modo de sacudidas.

**Parkinsonismo:** Afección que implique los tipos de cambios de movimiento observados en el mal de Parkinson. Estos problemas incluyen temblores, rigidez de los brazos y piernas y movimiento lento.

**Penetrancia:** Proporción de individuos portadores de un genotipo que muestran el fenotipo esperado, en unas condiciones ambientales concretas. Es decir la relación entre el número de individuos que presentan una enfermedad con el número de individuos que deberían presentarla conforme a su genotipo.

**Prion:** Partícula proteica infecciosa que produce enfermedades neurológicas degenerativas transmisibles.

**Psicosis:** Estado mental descrito como una escisión o pérdida de contacto con la realidad.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

# *Resumen.*

La enfermedad de Huntington (EH) se caracteriza por la presencia de síntomas como corea, ataxia, alteraciones psiquiátricas, cognitivas y demencia. Esta enfermedad es resultado de la expansión de trinucleótidos repetidos CAG en el gen *HTT* y se hereda con un patrón autosómico dominante. Se han descrito pacientes con fenotipo de EH que no presentan mutaciones en *HTT*, a estos padecimientos se les denomina fenocopias de la EH o bien, enfermedades Huntington-*like* (HDL). Entre los genes causantes de estas fenocopias se han descrito *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL*. La frecuencia de mutaciones en estos genes varía entre poblaciones y resulta de gran importancia el conocer su distribución en cada población a fin de optimizar el diagnóstico. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL* y su contribución en el desarrollo de fenocopias de la EH. Las secuencias de los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL* fueron analizadas en 102 pacientes mexicanos con fenotipo de EH sin mutación en el gen *HTT* mediante PCR y secuenciación automatizada tipo Sanger. El 4.90% de los casos presentó mutaciones en *JPH3* (alelos mutados con un rango de 42 a 53 repetidos CTG), el 1% presentó mutaciones en *TBP* (alelo con 43 repetidos CAG) y no se identificaron mutaciones en los genes *PRNP*, *ATN1* ó *FTL*. A diferencia de lo reportado para otras poblaciones a nivel mundial, en donde *TBP* presenta la mayor frecuencia de mutaciones, en nuestro estudio la mayor prevalencia fue en *JPH3*. Este trabajo aumenta la disponibilidad de pruebas genéticas para los casos de enfermedades Huntington-*like*, lo que permitirá confirmar el diagnóstico clínico de pacientes con una historia familiar establecida e incluir algunos casos que presentan síntomas atípicos, conllevando a un diagnóstico más eficiente, certero y así proporcionar un asesoramiento genético y los riesgos para la descendencia.

**Palabras clave:** Enfermedad de Huntington, fenocopias, Huntington-*like*, traslapamiento clínico, enfermedades neurodegenerativas.

# 1. *Introducción.*

## 1.1 Enfermedades Neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) son procesos crónicos, progresivos y están caracterizados por pérdidas selectivas de neuronas en los sistemas motor, sensorial y cognitivo (Segovia & Mora, 2002). Estos trastornos son de naturaleza multifactorial y tienen signos neuropatológicos característicos en común, así como una serie de procesos bioquímicos anormales (Cacciatore *et al.*, 2012; Segovia & Mora, 2002), como:

- a) Plegamiento anormal de proteínas y anomalías en el proceso proteolítico.
- b) Estrés oxidativo y formación de radicales libres.
- c) Deterioro de la bioenergética y disfunción mitocondrial.
- d) Alteraciones en las modificaciones post-traduccionales de proteínas nuevamente sintetizadas.
- e) Anomalías en los genes que intervienen en el acoplamiento (*splicing*).
- f) Expresión anormal y reducción de las proteínas degradadas.
- g) Procesos neuroinflamatorios.

La acumulación y agregación anormal de proteínas (específicas de cada enfermedad) conllevan a la neurodegeneración, por la formación de agregados intra o extracelulares en áreas específicas del cerebro. Las proteínas que se acumulan en las enfermedades neurodegenerativas son generalmente mal plegadas y producen estructuras de láminas  $\beta$ , que promueven la agregación y formación de fibrillas, lo que sugiere que estas son enfermedades con proteínas que presentan alteraciones conformacionales. Las mutaciones genéticas o los diferentes factores ambientales, como el estrés oxidativo y/o metabólico, pueden inducir agregación y plegamiento anómalo de proteínas, sin embargo los mecanismos exactos de agregación en diferentes trastornos neurodegenerativos aún no se comprenden completamente (Takalo *et al.*, 2013).

En gran parte como resultado del aumento de la esperanza de vida y los cambios demográficos de la población (por ejemplo, el envejecimiento), las demencias neurodegenerativas y los trastornos del movimiento en enfermedades neurodegenerativas son cada vez más comunes. A medida que nuestra población envejece, una mejor comprensión de estas enfermedades será vital para el desarrollo de terapias más eficaces y la lucha contra los costos personales, sociales y económicos de estas enfermedades (Skovronsky *et al.*, 2006). El conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades en los niveles molecular y genético contribuye al desarrollo de nuevos avances terapéuticos (Nieoullon, 2011).

## **1.2 Enfermedad de Huntington.**

La enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento neurodegenerativo, progresivo, con un patrón de herencia autosómico dominante, que se manifiesta a través de alteraciones neurológicas, psiquiátricas y trastornos cognitivos. Dicha enfermedad lleva este nombre en memoria del Dr. George Huntington, quien en 1872 realizó la primera descripción de la enfermedad. Durante mucho tiempo se ha conocido con el nombre de Corea (palabra de origen griego que significa “danza o baile”) de Huntington, debido a que una de las principales características clínicas de esta enfermedad son los movimientos involuntarios (coreoatetosis); sin embargo, en la actualidad se ha optado por la denominación de EH, ya que no todos los pacientes afectados presentan corea (Arango-Lasprilla *et al.*, 2003).

### **1.2.1 Características clínicas de la EH.**

Los síntomas y signos de la EH constan de trastornos motores, cognitivos, metabólicos y psiquiátricos. La edad de inicio promedio es entre los 30 y 50 años, con un rango de 2 a 85 años, debido a que por el fenómeno de anticipación (que se detalla en aspectos genéticos de la EH) se han presentado casos juveniles e infantiles de esta enfermedad. La duración de la enfermedad es de 17-20 años en promedio. La progresión de la enfermedad conduce a una mayor dependencia en la vida diaria y finalmente, la muerte. La causa más común de muerte es la neumonía, seguida del suicidio (Roos, 2010).

### **Síntomas motores.**

La característica principal de trastornos motores son movimientos involuntarios, no deseados. Los movimientos a menudo ocurren en las extremidades distales como dedos de manos y pies, pero también en músculos faciales. En la vida diaria, la marcha se vuelve inestable. Poco a poco, los movimientos involuntarios se extienden a todos los músculos, de distal a proximal. Los movimientos coreicos están presentes durante todo el tiempo que el paciente está despierto. Los movimientos coreicos faciales pueden dar lugar a un movimiento continuo de los músculos faciales, incluyendo muecas, y se extiende con movimientos espasmódicos rápidos y súbitos de los brazos, las piernas, la cara y otras partes del cuerpo. Hablar y tragar gradualmente se vuelve más problemático, pudiendo llevar a la asfixia en cualquier momento a algunos pacientes. En etapas más avanzadas el paciente presenta mutismo; la disartria y la disfagia se vuelven prominentes. Todos los pacientes desarrollan rigidez, bradicinesia y acinesia. La distonía puede ser el primer signo motor en la EH. Los signos cerebelosos pueden aparecer de forma esporádica. El caminar es a menudo descrito de tipo atáxico o marcha inestable. Distinguir entre una caminata coreica y atáxica es muy difícil. Los signos piramidales (signo de Babinski) están presentes en todos los casos. La influencia de perturbaciones motoras en la vida diaria progresa con el tiempo. La presencia de hipercinesia e hipocinesia resulta en dificultades para caminar y estar parado, con frecuencia conduce a una marcha atáxica y caídas frecuentes. Además, las actividades diarias, como levantarse de la cama, tomar una ducha, vestirse, ir al baño, limpiar la casa, cocinar y comer cada vez son más difíciles. Dependiendo del tipo de trabajo que hace el paciente los signos motores interferirán tarde o temprano con el rendimiento, incluso si los cambios psiquiátricos y cognitivos se encuentran todavía ausentes (Roos, 2010).

### **Síntomas cognitivos.**

El deterioro cognitivo de la EH incluye enlentecimiento del proceso de pensamiento y el deterioro de las funciones ejecutivas, como la organización, la planificación, el control o la adaptación de las alternativas, y retrasa la adquisición de nuevas habilidades motoras. Típicamente, los pacientes reportan dificultades

en la concentración y la memoria a corto plazo. Pensar se vuelve más concreto y menos eficiente, la planificación, iniciación y organización del tiempo, se vuelven más difíciles. Las personas con la EH son a menudo impulsivas. La percepción visual-espacial también puede deteriorarse. Estas características empeoran con el tiempo, el habla se deteriora más rápido que la comprensión. A diferencia de la cognición, síntomas psiquiátricos y de comportamiento surgen con cierta frecuencia, pero no muestran una progresión gradual con la severidad de la enfermedad (Novak & Tabrizi, 2010; Walker, 2007).

### **Síntomas psiquiátricos.**

Con la progresión de la enfermedad el deterioro cognitivo empeora y conduce a la demencia. La depresión es típica y el suicidio se estima en alrededor de cinco a diez veces más que lo reportado para la población general (alrededor del 5-10%). Los síntomas maníacos y psicóticos se pueden desarrollar. En las primeras etapas de la EH, los sujetos experimentan con frecuencia deterioro en la habilidad de resolución de problemas, dificultades con las habilidades visuo-espaciales y trastornos de atención, lo que puede conducir a una disminución en el rendimiento de trabajo. Los cambios de personalidad ocurren a menudo en las primeras etapas y pueden asociarse con la depresión, que es el trastorno psiquiátrico más frecuente, que afecta hasta un 50% de pacientes. Otros síntomas psiquiátricos reportados incluyen el trastorno obsesivo-compulsivo, inestabilidad del estado de ánimo, arrebatos de ira, psicosis, paranoia, ansiedad, irritabilidad y apatía. La incidencia del suicidio en los pacientes con EH es alta (80% de los afectados presenta tendencia suicida) y se considera uno de los principales factores de riesgo de la misma. El diagnóstico puede ser oscurecido por otras características de la enfermedad; la depresión, por ejemplo, puede ser difícil de detectar en un paciente que ha alterado las expresiones faciales y el tono de voz.

Por el contrario, las alteraciones del sueño y los síntomas metabólicos como la pérdida de peso pueden ser erróneamente atribuidos a la depresión (Novak & Tabrizi, 2010; Wider & Lüthi-Carter, 2006).

## **Síntomas metabólicos.**

La EH provoca la pérdida involuntaria de peso, en los adultos se considera clínicamente importante cuando supone un 5% o más respecto al peso habitual, en un período de entre 6 meses y 1 año. Su importancia radica en que se asocia con un incremento en la tasa de mortalidad en pacientes con EH. Las alteraciones psiquiátricas e idiopáticas son un factor determinante en esta pérdida de peso, en donde la causa más frecuente es la depresión. Aunado a esto también se han observado otros síntomas metabólicos como disfunción endocrina y trastornos del sueño. (Novak & Tabrizi, 2010).

### **1.2.2 Características neuropatológicas de la EH.**

Los estudios neuropatológicos y de neuroimagen han demostrado que las anomalías cerebrales se desarrollan antes de que se manifiesten los síntomas más evidentes, estas anomalías son progresivas y finalmente, implican a todo el cerebro en mayor o menor medida, lo que resulta en aproximadamente el 25% de pérdida de peso del cerebro en una EH avanzada. Sin embargo, la neuropatología más prominente en EH se produce dentro del cuerpo estriado de los ganglios basales, en el que la atrofia se acompaña de una extensa pérdida neuronal y astrogliosis, ambos se vuelven más graves conforme la enfermedad avanza, conduciendo a una gran dilatación de los ventrículos laterales (Figura 1) (Reiner *et al.*, 2011).

Las alteraciones fisiopatológicas incluyen la degeneración de la cabeza del núcleo caudado y otras áreas del cuerpo estriado, así como atrofia cortical frontal, pérdida selectiva de las neuronas GABAérgicas, las cuales están presentes en dichas regiones neuroanatómicas; y degeneración de las capas profundas de la corteza, principalmente frontales (Arroyave & Riveros, 2006).



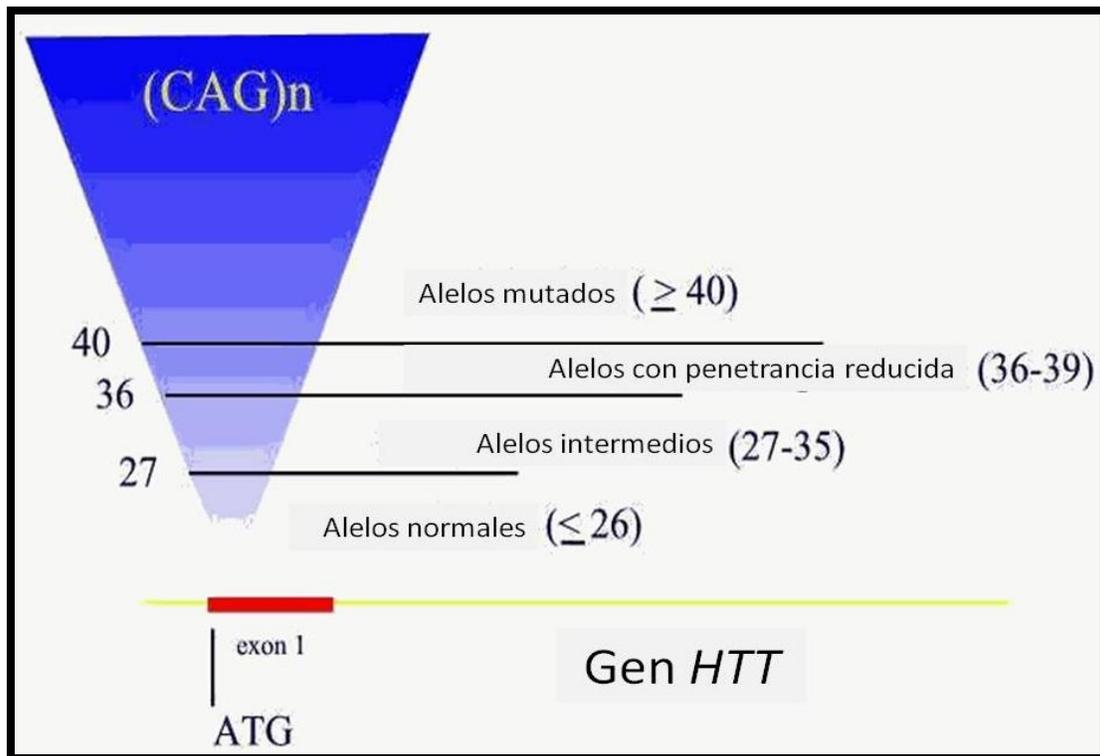
**Figura 1.** Corte coronal de encéfalo humano, mostrando de lado izquierdo un paciente con EH avanzada, donde se observa una pérdida de volumen a nivel del cuerpo estriado y de la corteza cerebral, además de ventriculomegalia. De lado derecho se aprecia el encéfalo de un individuo sano. Tomado de Reiner *et al.*, 2011.

### 1.2.3 Características genéticas de la EH.

La EH es un trastorno neurodegenerativo, monogénico, de penetrancia variable y similar a otras enfermedades causadas por proteínas mal plegadas. Esta enfermedad es causada por una expansión de trinucleótidos repetidos CAG en el gen *HTT* localizado en el cromosoma 4p16.3 (Roos & Tabrizi, 2011). El *locus* de la EH presenta 180Kb conformado por 67 exones y codifica para una proteína denominada huntingtina (cuyas características se mencionan más adelante). El repetido CAG (que se traduce en un segmento de poliglutaminas denominadas poliQ) se encuentra en el exón 1 de todos los vertebrados con el gen homólogo de la EH. Se han identificado homólogos al gen humano en diversas especies, incluyendo otros primates, cerdo, ratón, pez globo, pez cebra, *Drosophila*, equinodermos, y ascidias; conservando la estructura de la huntingtina a través de la evolución. (Reiner *et al.*, 2011; Benítez-Burraco, 2009).

La enfermedad presenta un patrón de herencia autosómico dominante, con una penetrancia dependiente de la edad. Repetidos CAG grandes predicen un inicio temprano (Roos & Tabrizi, 2011). De esta forma la edad de inicio y la severidad de la enfermedad están asociadas con el número de repetidos CAG. Si un individuo porta 26 repetidos CAG (o menos) el no expresará la enfermedad por

lo que estos se consideran alelos normales. Entre 27-35 repetidos el alelo afectado puede o no ser transmitido a la siguiente generación, pero el individuo no presentará la enfermedad, en este rango se consideran alelos intermedios. De 36-39 repetidos la enfermedad es más propensa a expresarse, por lo que estos se consideran alelos con penetrancia reducida, y en más de 40 repetidos la EH tiene penetrancia del 100% ya que se consideran alelos mutados (Figura 2) (Wright, 2004).



**Figura 2.** Rango de alelos para el tamaño del trinucleótido repetido CAG que se presenta en el exón 1 del gen *HTT*. Tomado y modificado de Wright, 2004.

El repetido CAG en la EH es altamente inestable, mostrando expansiones y contracciones en el tamaño del repetido a través de las subsecuentes generaciones. En humanos el expandido del repetido CAG es inestable en un 80% de las transmisiones. El tamaño y dirección de la inestabilidad puede diferir dependiendo del género del progenitor afectado. En transmisiones maternas, el número de expansiones y contracciones observadas son casi iguales entre hijos y progenitor, y son dadas por cambios de dos a tres repetidos. Por el contrario, en la transmisión paterna es frecuente una mayor expansión, y en algunos casos el

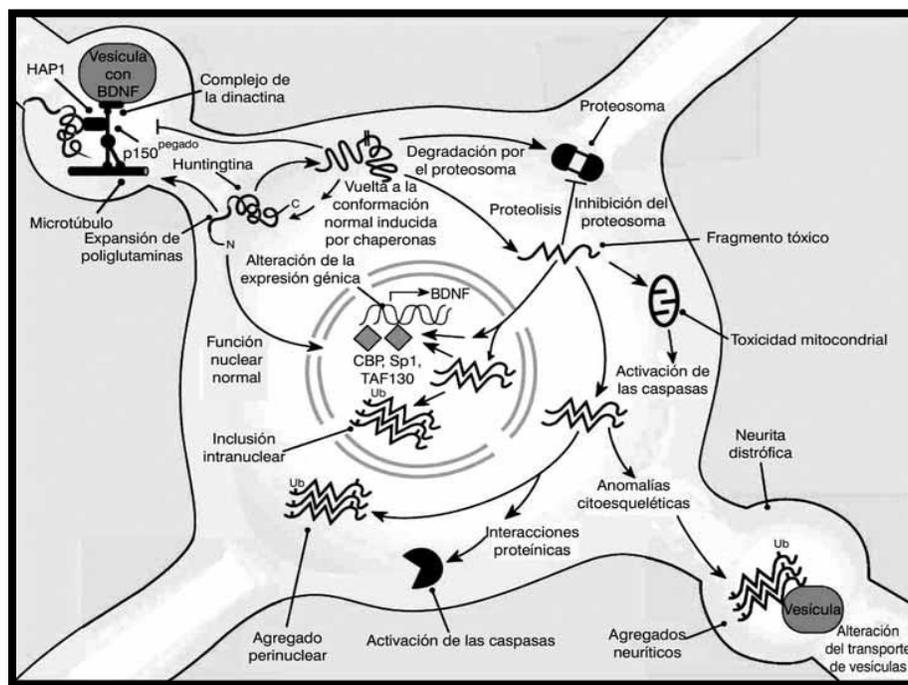
incremento del tamaño en el número de repetidos puede ser mayor a 10, que origina un fenómeno de anticipación, el cual implica que si la herencia del alelo afectado proviene de vía paterna la descendencia presentará un mayor número de repetidos con respecto al del progenitor así como una edad de inicio más temprana (casos infantiles y juveniles). Se ha demostrado una inestabilidad meiótica modesta en pacientes con EH. Se han propuesto tres mecanismos para explicar la inestabilidad de repetidos: El deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del DNA, la falta de alineación en los sistemas de reparación por escisión y la desigualdad de entrecruzamiento y recombinación (Ersoy, 2007).

### **La proteína huntingtina.**

La huntingtina es una proteína compuesta de 3,114 aminoácidos, de aproximadamente 350 KDa (Zheng & Diamond, 2012), se expresa en todas las células humanas y de mamíferos, con altas concentraciones en cerebro y testículos, y en cantidades moderadas en hígado, corazón y pulmón (Rosales-Reynoso & Barros-Núñez, 2008). Esta proteína se encuentra en diversos orgánulos, incluyendo núcleo, membrana plasmática, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria. La función precisa de la huntingtina aún es desconocida, sin embargo, se cree que participa como una proteína antiapoptótica, en la transcripción (interactúa con diversos factores de transcripción y proteínas reguladoras de la transcripción), como regulador de la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el transporte de vesículas celulares, en la transmisión y plasticidad sináptica (Zheng & Diamond, 2012).

En condiciones normales, la huntingtina ejerce sus efectos tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. Entre sus posibles funciones se encuentran la regulación del tráfico de las vesículas que contienen el BDNF a lo largo de los microtúbulos del citoesqueleto, el cual se ve alterado cuando está presente la proteína mutada, que cuenta con una conformación diferente a la habitual. La huntingtina anómala no puede ser degradada proteolíticamente, debido a que es desconocida por el proteasoma, por lo que termina agregándose tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula. El extremo amino terminal, que

contiene la expansión repetida, adopta una conformación de lámina  $\beta$ , que da lugar a la formación de oligómeros o, incluso, de agregados insolubles, debido a la inhibición del proteasoma, a la activación de caspasas o a efectos mitocondriales no determinados. Los agregados se acumulan en las regiones perinucleares o neuríticas, y resultan ubiquitinados. La proteína mutada también se trasloca al núcleo, donde forma inclusiones, la toxicidad nuclear parece deberse a que se produce una interferencia del patrón normal de transcripción de diversos genes, en particular, de los que codifican determinadas moléculas neuroprotectoras, como el propio BDNF (Figura 3) (Benítez-Burraco, 2009). Por esta razón el segmento de poliglutaminas (codificadas por el repetido CAG) en la proteína expresada, produce efectos neurotóxicos por una ganancia de función (Duzdevich *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Modelo esquemático celular del proceso de patogénesis responsable de la enfermedad de Huntington. La huntingtina anómala resulta desconocida por el proteasoma, provocando agregados citoplasmáticos y nucleares en la célula. El extremo amino terminal, que contiene la expansión repetida, adopta una conformación de lámina  $\beta$ , que resulta en agregados insolubles. La proteína mutada se trasloca al núcleo en donde la toxicidad nuclear que se produce puede deberse a una interferencia del patrón normal de transcripción de diversos genes. Tomado de Benítez-Burraco, 2009.

#### **1.2.4 Prevalencia de la EH.**

La EH tiene una tasa de incidencia en Estados Unidos y Europa de 5 a 10 casos por cada 100,000 personas, esta incidencia es baja en Japón, China, Finlandia, y África. Por el contrario, para América Latina no existe información suficiente sobre la prevalencia de la EH (Alonso *et al.*, 2009). En la Ciudad de México se ha reportado un rango de 4 casos por cada 100,000 individuos, mientras que en la población general de Venezuela se reporta 1 caso por cada 200,000 individuos (Gatto *et al.*, 2012).

Sin embargo, aunque estos casos son poco frecuentes hay que tener en cuenta que es probable que aumente su incidencia en un futuro, sobre todo en pequeñas poblaciones endogámicas y aisladas, que todavía son comunes en México, como es el caso de diversas comunidades indígenas (Alonso *et al.*, 2002).

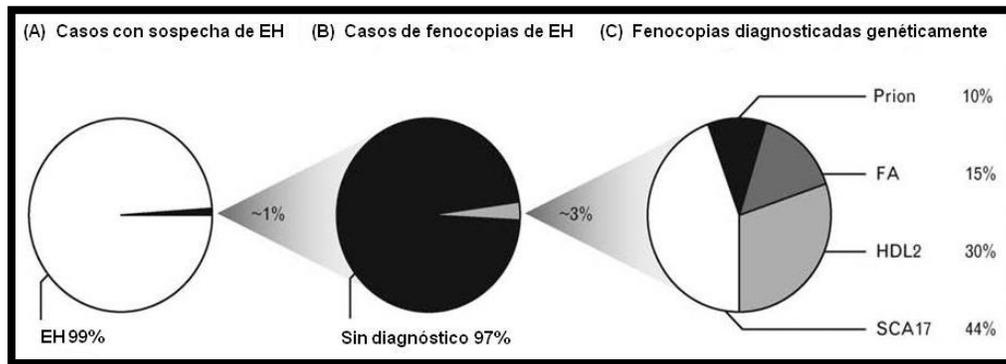
#### **1.3 Enfermedades Huntington-like.**

El gen responsable de la EH se descubrió en 1993 y desde entonces se ha reconocido una pequeña proporción de pacientes con un cuadro clínico similar a la EH, pero que no presentan la mutación causante de EH. Esto se debe a que el fenotipo de EH tiene numerosas causas y orígenes incluyendo las etiologías genéticas y adquiridas. Esta evidencia indica la existencia de otros trastornos genéticos que se conocen como enfermedades Huntington-like (HDL) (Schneider *et al.*, 2007) o fenocopias de la EH.

El término fenocopia de la EH se emplea cuando una enfermedad se asemeja fenotípicamente a la EH y esta puede ser producida por diversos factores, incluyendo causas ambientales y genéticas (con excepción de la expansión de trinucleótidos en el gen *HTT*) (Wild & Tabrizi, 2007).

Se estima que del 1-7% de los casos con sospecha de EH resultan ser fenocopias. Estos casos incluyen a las enfermedades Huntington-like y otras enfermedades genéticas (posteriormente se mencionan) que imitan la presentación de la EH (Figura 4) (Gövert & Schneider, 2013; Martino *et al.*, 2013).

Un gran número de patologías están asociadas a fenotipos de EH, por ello es importante realizar un diagnóstico diferencial (Tabla 1) con la finalidad de identificar la patología de la que se trata y de este modo conllevar al paciente a un diagnóstico y tratamientos adecuados. Las patologías con fenotipos similares a la EH más comunes son: HDL1, 2, 4, atrofia dentatorubro-páldoluisiana, neuroferritinopatía, ataxia espinocerebelosa tipo 1, 2, 3, 7, 14, ataxia de Friedreich, neuroacantocitosis, y corea hereditaria benigna. Sin embargo el solapamiento clínico se puede presentar también con neurodegeneración por acumulación de hierro tipo 1 (*PKAN*) o pantotenato-cinasa, síndrome de McLeod, ataxia con apraxia oculomotora tipo 1 y 2, enfermedad de Wilson, síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Kufor Rakeb (Martino *et al.*, 2013).



**Figura 4.** Incidencias relativas de (A) Fenocopias de EH, (B) Diagnóstico genético exitoso de fenocopias de la EH y (C) Fenocopias diagnosticadas genéticamente. FA, ataxia de Friedreich; HDL, enfermedad Huntington-like; SCA, ataxia espinocerebelosa. Tomado y modificado de Wild & Tabrizi, 2007.

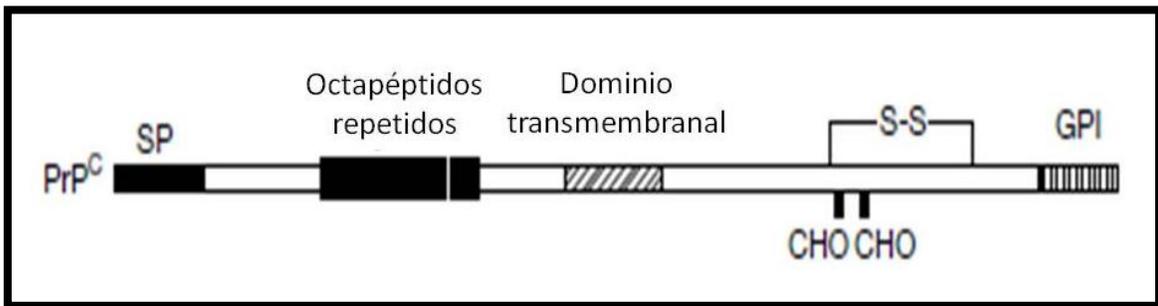
**Tabla 1.** Enfermedades autosómico dominante en las que se presentan movimientos coreicos. Tomado y modificado de Schneider *et al.*, 2007.

Enfermedad	Gen	Localización cromosómica	Traslapamiento con EH
EH	<i>HTT</i>	4p16.3	Características clínicas en común: ataxia, demencia, trastornos de movimiento (corea).
HDL1	<i>PRNP</i>	20p12	
HDL2	<i>JPH3</i>	16q24	
HDL4 (SCA17)	<i>TBP</i>	6q27	
DRPLA	<i>ATN1</i>	12p13.31	
Neuroferritinopatía	<i>FTL</i>	19q13	

Abreviaturas: HDL, enfermedad Huntington-like; SCA, ataxia espinocerebelosa; DRPLA, atrofia dentatorubro-páldoluisiana.

#### 1.4 Enfermedad Huntington-like 1 (HDL1).

La HDL1 es una enfermedad priónica familiar, tiene una prevalencia a nivel mundial de un afectado por cada 1,000,000 individuos. El trastorno neurodegenerativo sigue un patrón de herencia autosómico dominante y es causada por una inserción de 192 pares de bases (pb) en una región codificante de octapéptidos repetidos para la proteína prion, codificada por el gen *PRNP* que se localiza en el cromosoma 20p12. La edad media de inicio es entre los 20 y 45 años de edad. El curso de la enfermedad es progresivo, con una sobrevivencia de 1-10 años después del inicio. Los síntomas clínicos de la HDL1 son bastante similares a la EH, con un prominente cambio de personalidad, síntomas psiquiátricos y deterioro cognitivo, corea, rigidez y disartria. Además se ha observado ataxia de extremidades y tronco. El análisis neuropatológico en HDL1 ha mostrado atrofia y depósito de proteína prion en ganglios basales, lóbulos frontales, temporales, y corteza cerebelar. Histopatológicamente en comparación con otras enfermedades priónicas, la espongiosis no es prominente en las zonas con depósitos de la proteína prion (Gövert & Schneider, 2013).



**Figura 5.** Representación esquemática de la proteína prion celular, donde se puede apreciar la región de octapéptidos repetidos. En casos de HDL1 la región de octapéptidos repetidos presenta inserciones lo que resulta en un corrimiento del marco de lectura de la proteína. S-S, puentes disulfuro; CHO, sitios de glicosilación; GPI, grupo glicosilfosfatidilinositol. Tomado y modificado de Cappai & Collins, 2004.

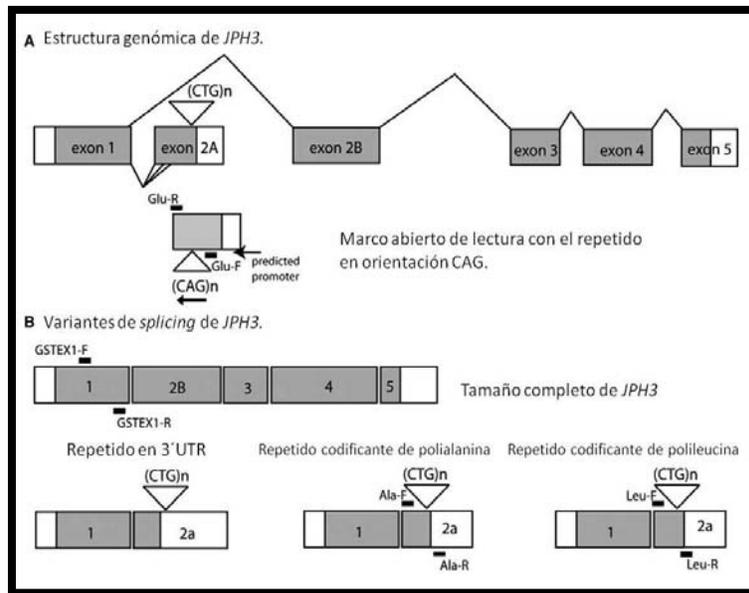
Se sugiere que a los individuos con HDL se les realice un análisis para mutaciones en *PRNP* si la huntingtina presenta un rango normal en el tamaño del repetido CAG, especialmente si se presentan signos atípicos de EH (como demencia de rápida evolución) (Moore *et al.*, 2001).

## 1.5 Enfermedad Huntington-*like* 2 (HDL2).

La HDL2 es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante, clínicamente indistinguible de la EH. Es causada por una expansión del trinucleótido CTG en el gen *JPH3* (Figura 6), que codifica para la proteína junctofilina-3. Este gen se localiza en el *locus* 16q24. Los alelos normales contienen de 6 a 28 trinucleótidos, mientras que el rango de repetidos patológicos va de 40 a 59 (Seixas *et al.*, 2012).

La proteína junctofilina-3, que se expresa principalmente en cerebro, juega un papel esencial en la unión de estructuras de membrana celular y participa en la regulación de calcio intracelular. Existen diferentes transcritos como causa del *splicing* alternativo y de diferentes señales de poliadenilación, por lo que el repetido CTG se puede localizar en el exón 1. Cuando la proteína se encuentra mutada presenta segmentos anormales de polileucina, provocando que la proteína se agregue formando inclusiones intranucleares que resultan tóxicas para la célula (Walker *et al.*, 2003) aunque el mecanismo patogénico de HDL2 aún no es bien conocido. Estudios recientes muestran que el repetido CUG genera RNA *foci* que son suficientes para causar toxicidad celular en HDL2 (Santos *et al.*, 2008).

Los signos y síntomas incluyen una prominente pérdida de peso, coordinación deficiente, rigidez, disartria, hiperreflexia, bradicinesia, distonía y temblores, con una corea mínima y movimientos anormales de ojos. La demencia y los síntomas psiquiátricos son frecuentes. Se presenta una severa atrofia que afecta el núcleo caudado, putamen y una menor atrofia en globo pálido (Greenstein *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Representación esquemática del gen *JPH3* y sus transcritos. (A) estructura genómica de *JPH3*, con regiones codificantes. El marco abierto de lectura codificando el repetido en orientación CAG en la hebra complementaria de *JPH3*. (B) Variantes de *splicing* de *JPH3*. El tamaño completo de la junctofilina-3 consta de 5 exones y estos no contienen el exón con el repetido, mientras que las 3 variantes de *splicing* con el exón 2A contienen el repetido en diferentes marcos de lectura. Tomado y modificado de Seixas *et al.*, 2012.

### 1.6 Enfermedad Huntington-like 3 (HDL3).

La HDL3 es una enfermedad neurodegenerativa, que sigue un patrón de herencia autosómico recesivo. Actualmente solo se han reportado en dos familias de Arabia Saudita quienes presentaron un inicio temprano, además de características clínicas y radiológicas similares a la EH juvenil (Al-Tahan *et al.*, 1999). Las características clínicas fueron deterioro mental, disartria, distonía, signos piramidales, ataxia y dificultad para caminar. Los estudios de imagen muestran atrofia de corteza frontal y núcleo caudado. El *locus* de esta enfermedad inicialmente se mapeo en el cromosoma 4p15.3 (Kambouris *et al.*, 2000); sin embargo, se ha sugerido que la evidencia para este enlace es débil. Aunque esta condición ha sido llamada HDL3, no presenta las mismas características de los HDL con respecto a la edad de inicio y el patrón de herencia (Schneider *et al.*, 2007). El gen causante de la enfermedad no ha sido determinado, sin embargo se considera al gen *DRD5* como candidato (Wild & Tabrizi, 2007).

## 1.7 Enfermedad Huntington-like 4 (HDL4)/Ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17).

La SCA17 también conocida como la HDL4, pertenece al grupo de las ataxias espinocerebelosas con un patrón de herencia autosómica dominante. La mutación es causada por una expansión del repetido CAG/CAA en el gen *TBP* que codifica para la proteína de unión a la caja TATA y que se localiza en el *locus* 6q27; esta expansión de trinucleótidos repetidos ocasiona segmentos poliQ en la proteína (Toyoshima *et al.*, 2004). El rango normal de repetidos va de 25 a 37, las expansiones entre 38 y 42 repetidos puede constituir un rango intermedio con penetrancia incompleta y mutados a partir de 43 repetidos, siendo de 66 repetidos el número más alto reportado hasta la fecha (Bech *et al.*, 2010).

La proteína de unión a la caja TATA es un importante factor de transcripción, esta proteína es una subunidad de unión a DNA y forma parte del complejo transcripcional junto con la RNA polimerasa II. La proteína de unión a la caja TATA juega un papel esencial a nivel del promotor para el correcto posicionamiento de la polimerasa sobre el DNA. Las características clínicas de la HDL4 son predominantemente inestabilidad de la marcha u otros trastornos de movimiento, como distonía o corea. Las alteraciones psiquiátricas como cambios de humor, psicosis, depresión, y demencia en algunos casos. La presencia de estas características, muestran un marcado traslapamiento de los datos clínicos entre los fenotipos de SCA17 y los fenotipos existentes de las HDL (Stevanin & Brice, 2008).

La expansión del repetido CAG/CAA en el gen *TBP* representan la causa monogénica más común para el fenotipo HDL, esto debido a los niveles de incidencia a nivel internacional y debe ser considerada uno de los primeros genes a descartar en los pacientes con movimientos coreicos, alteraciones psiquiátricas y de la conducta, en aquellos pacientes o casos negativos para la mutación en el gen de la EH (Bauer *et al.*, 2004).

## 1.8 Atrofia dentatorubro-pálidoluisiana (DRPLA).

La DRPLA es una enfermedad neurodegenerativa que pertenece al grupo de enfermedades causadas por expandidos poliQ. El fenotipo de esta enfermedad es variable, sin embargo incluye ataxia, movimientos coreicos, epilepsia mioclónica, demencia, atrofia cerebral y cerebelar. Esta enfermedad es causada por una expansión del trinucleótido repetido CAG en el gen *ATN1* que codifica para la proteína atrofina-1 y se localiza en el cromosoma 12p13.31 (Veneziano *et al.*, 2014). Los alelos normales contienen hasta 35 repetidos y son altamente polimórficos, mientras que los alelos patológicos tienen de 40 a 100 repetidos CAG. La DRPLA es más frecuente en Japón, y se han identificado diversas familias sin ancestría japonesa con la enfermedad (Martins *et al.*, 2003).

La atrofina-1 se localiza en el núcleo y citoplasma de las neuronas, aun se desconoce su función fisiológica precisa, pero se ha demostrado que esta proteína en su conformación normal se une a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), por lo que en su forma mutada se relaciona a una patogénesis metabólica que involucra a GAPDH como componente funcional (Burke *et al.*, 1996). En su forma mutada esta proteína es desconocida por el proteasoma por lo que se acumula en el núcleo e incrementa la toxicidad celular, estos agregados intranucleares inducen a la apoptosis (Suzuki & Yazawa, 2011). Esta patología está relacionada estrechamente con la EH ya que presentan un fenotipo similar y por ende un traslapamiento del cuadro clínico, además la huntingtina se encuentra relacionada como un regulador de la atrofina-1 por lo que ambas proteínas pudieran estar ligadas a la interacción con la GAPDH, aunque el mecanismo aun no ha sido bien dilucidado (Burke *et al.*, 1996).

## 1.9 Neuroferritinopatía.

Las alteraciones en el metabolismo del hierro se han relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas. Se denomina neurodegeneración asociada a depósito de hierro, a un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias. La ferritinopatía hereditaria o neuroferritinopatía es una enfermedad neurodegenerativa, autosómico dominante, causada por mutaciones en el gen *FTL* que codifica para la ferritina de cadena ligera, y que se localiza en el cromosoma 19q13.33. La ferritina tiene un papel central en la homeostasis del hierro, su función es unir y secuestrar el hierro intracelular evitando que pueda realizar su acción oxidante y favorecer el desarrollo de radicales libres perjudiciales para las células. El fenotipo clínico de las neuroferritinopatías es caracterizado por su afección en el sistema nervioso central, como movimientos anormales (corea, distonía, bradicinesia, rigidez) y disartria. También pueden agregarse signos cerebelosos y temblor postural. A diferencia de la EH, el deterioro cognitivo se limita a una disfunción subcortical del lóbulo frontal. La neuropatología está caracterizada por la presencia de cuerpos de inclusión de intranuclear e intracitoplasmáticos de ferritina, en células de la glía y en algunas neuronas, y depósitos anormales de hierro. La proteína mutada produce acumulación de hierro intracelular lo que favorece la formación de agregados de ferritina y daño oxidativo mediante la producción de radicales libres. Este proceso se considera una ganancia de función tóxica, más que una pérdida de la misma (Muhoberac & Vidal, 2013). Ya que la ferritina es la principal proteína encargada del almacenamiento de hierro intracelular, ejerce su función principal en la regulación del metabolismo de hierro intracelular y la detoxificación de hierro (Barbeito *et al.*, 2010).

Hasta abril de 2013 se han reportado siete mutaciones (inserciones, deleciones y duplicaciones) patogénicas en el gen *FTL* como causantes de neuroferritinopatías (Tabla 2) (Keogh *et al.*, 2013).

**Tabla 2.** Mutaciones patogénicas en *FTL*. Tomado y modificado de Keogh *et al.*, 2013.

Exón	Mutaciones descritas
3	474G>A
4	441InsC
4	445_446DupGACC
4	458InsA
4	460InsA
4	469_484DupGGCCCGGAGGCTGGGC
4	498InsTC

Seis de estas mutaciones ocurren en el exón 4, con la excepción de una que ocurre en el exón 3. Todas las mutaciones en el exón 4 son inserciones o duplicaciones, su tamaño varía en un rango de 1 a 16 bases, ocasionando un corrimiento en el marco de lectura del gen *FTL*, lo cual resulta en una proteína de mayor longitud y en algunos casos codones de paro prematuros. El único reporte existente de mutación en el exón 3 es a causa de una mutación puntual (Keogh *et al.*, 2013).

Estas patologías ya descritas son clínicamente importantes por sí mismas, pero también pueden arrojar a la luz una importancia considerable sobre la patogénesis de la EH. La EH produce una gama de fenotipos clínicos y un gran número de patologías que pueden ser responsables de las fenocopias de la EH al imitar esta gama de fenotipos clínicos. Aunque diversos estudios establecen que la mayoría de los pacientes con fenocopias permanecen sin diagnóstico, es de vital importancia realizar un diagnóstico diferencial entre las HDL, DRPLA y padecimientos por acumulación de hierro (como la neuroferritinopatía), con la finalidad de identificar la patología de la que se trata para proporcionar un diagnóstico adecuado, un tratamiento de acorde a la enfermedad de la que se trate y finalmente, conllevar a un asesoramiento genético asertivo (Wild & Tabrizi, 2007).

## 2. Antecedentes.

Las HDL son un grupo de padecimientos que presentan alteraciones clínicas que asemejan a la EH. Se han descrito cuatro HDL (HDL1, HDL2, HDL3 y HDL4) y otros padecimientos (como la DRPLA o la neuroferritinopatía) que se consideran fenocopias de la EH. En todas ocurren alteraciones cerebrales progresivas que se caracterizan por manifestaciones de movimientos incontrolados (corea), alteraciones psiquiátricas y pérdida de la memoria, que ocurren en pacientes con las características clínicas de la EH, pero que no poseen las mutaciones propias de la enfermedad de Huntington.

En diferentes poblaciones a nivel internacional se han presentado casos de HDL, por ejemplo, Castilhos *et al.* (2013) realizaron un estudio para determinar la frecuencia de EH, HDL1, HDL2, SCA2, SCA 17, DRPLA, corea hereditaria benigna, neuroferritinopatía y corea por acantocitosis en familias brasileñas con varios individuos que presentaban fenotipo de EH. Analizaron un total de 104 familias, de las cuales 93 fueron positivas para EH, 4 para HDL2 y una familia para SCA2. Se identificó EH e un 89.4% de los casos, HDL2 en 3.8% y SCA2 en 1% de las 104 familias brasileñas. No se encontraron casos de HDL1, SCA17, DRPLA, neuroferritinopatía, corea hereditaria benigna o corea por acantocitosis y solo seis familias (5.8%) quedaron sin diagnóstico.

En 2011, Rodrigues *et al.*, caracterizaron clínica y genéticamente a 29 pacientes brasileños con fenotipo de EH pero sin mutación en el gen *HTT*. Para esto determinaron la frecuencia de HDL2, SCA1, 2, 3, 17, DRPLA y corea acantocitosis. Los resultados de su estudio reportaron: tres casos (10.3%) de HDL2, y dos casos (6.8%) con corea por acantocitosis. No se presentaron casos positivos para SCA1, 2, 3, 17 y DRPLA. Sin embargo determinaron que la causa más común del fenotipo HDL es HDL2, esto atribuido a la ancestría africana de la población brasileña.

Por otra parte Sulek-Piatkowska *et al.* (2008) realizaron un estudio de 224 pacientes provenientes de Polonia con diagnóstico clínico de la EH, de los cuales 159 resultaron negativos para mutaciones en el gen *HTT*. Realizaron el análisis de los genes *JPH3*, *ATN1* y *TBP*, encontraron rangos de alelos normales para *JPH3* (9-26 repetidos CTG) y *ATN1* (18-29 repetidos CAG). Mientras que en el análisis molecular del gen *TBP* se encontró un caso positivo con 55 repetidos CAG/CAA (SCA17/HDL4) en una mujer de 43 años de edad que presentaba manifestaciones clínicamente similares a la EH.

Wild *et al.* (2008) analizaron un total de 285 pacientes ingleses con fenotipo de EH, pero negativos para la expansión en el gen *HTT*. Estos casos se seleccionaron para la búsqueda de mutaciones en los genes *PRNP*, *JPH3*, *TBP*, *ATN1*, *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *FTL* y *FRDA*; en donde obtuvieron un total de ocho pacientes positivos: cinco casos para SCA17/HDL4, uno para HDL1 (con 6 inserciones de octapeptidos repetidos para el gen *PRNP*), uno para HDL2 y uno para ataxia de Friedreich (gen *FRDA*). En este estudio no reportaron casos positivos para mutaciones en *ATN1*, *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *FTL*.

Costa *et al.* (2006) analizaron un total de 107 muestras de pacientes portugueses, que resultaron negativos para el expandido del repetido CAG en el gen de la EH, en donde buscaron mutaciones para los genes *PRNP*, *JPH3*, *TBP*, *ATN1*, *CREBBP*, *POU3F2* y *FTL*. Posterior al análisis de las 107 muestras no encontraron mutaciones en ninguno de los genes en cuestión, sin embargo se determinaron las frecuencias alélicas para cada uno de los pacientes, además se encontró un paciente con un alelo de 41 repetidos CAG/CAA en el gen *TBP*, lo cual se considera un alelo intermedio de penetrancia incompleta. A pesar de no encontrar mutaciones para alguno de los genes que analizaron ellos proponen ampliar el número de genes a estudiar y así analizar enfermedades que imiten la presentación clínica de la EH y que sean más frecuentes en su población.

En este contexto el realizar un análisis sobre los pacientes HDL permite conocer las principales enfermedades que provocan el traslapamiento clínico y las frecuencias de las mismas para una subpoblación mexicana, ya que no existen trabajos previos a fenocopias de la EH en México.

### 3. *Justificación.*

Existe un número considerable de pacientes con fenotipo clínico similar a EH sin mutaciones por expansión CAG en el gen *HTT*, lo cual sugiere la presencia de fenocopias de esta enfermedad en nuestra población. Siendo necesario determinar cuando estos casos negativos para EH son debidos a heterogeneidad de *locus* y de esta manera obtener un diagnóstico molecular certero.

Las enfermedades Huntington-*like* y otras enfermedades como la DRPLA y la neuroferritinopatía presentan un traslape considerable de síntomas con la EH, lo cual representa un problema para el diagnóstico clínico haciendo casi imposible diferenciar entre estos padecimientos. De ese modo el diagnóstico molecular nos permitirá la correcta identificación de estos fenotipos, comprender los aspectos médicos y biológicos de los mismos; el curso probable de la enfermedad, las causas y/u origen genético, así como el patrón de herencia, siendo esta última una de las más importantes debido a que permitirá conocer el riesgo de repetición o de nuevos casos.

El conocer la frecuencia y distribución de estas mutaciones en nuestra población permitirá generar un algoritmo diagnóstico que facilitará la identificación de los nuevos casos con HDL, conllevando a un asesoramiento genético asertivo y oportuno.

## 4. Hipótesis.

Pacientes con características clínicas de EH que no presentan alelos mutados por la expansión del trinucleótido CAG en el gen *HTT*, son portadores de una mutación en alguno de los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* ó *FTL*.

## 5. Objetivos.

### General.

Determinar la incidencia de mutaciones en los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL* en pacientes mestizo mexicanos con fenotipo de Enfermedad de Huntington.

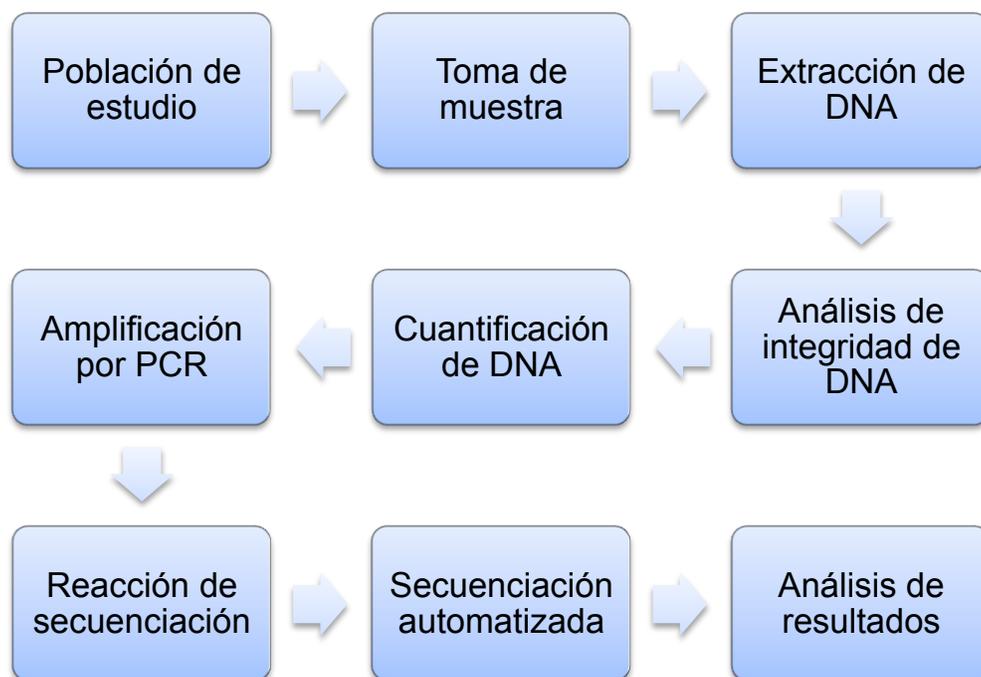
### Particulares.

- 1) Determinar la frecuencia de las variantes génicas presentes en una subpoblación de pacientes con fenotipo de EH en los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL*.
- 2) Establecer una relación genotipo-fenotipo de las mutaciones encontradas.
- 3) Realizar un algoritmo diagnóstico para la identificación de fenocopias de la EH.
- 4) Estandarizar una técnica de análisis de fragmentos como método de estudio para HDL4/SCA17.

# 6. Material y métodos.

## 6.1 Diseño experimental.

El diagrama general de la metodología que se realizó para la identificación de mutaciones en cada uno de los genes a estudiar, es presentado en la Figura 7. Cada uno de los pasos será detallado más adelante.



**Figura 7.** Metodología general realizada para el análisis de mutaciones en cada uno de los genes a estudiar.

## 6.2 Población de estudio.

A partir del banco de datos de pacientes con fenotipo clínico de EH, se seleccionaron 102 pacientes mestizos mexicanos, diagnosticados previamente como negativos para la mutación en el gen *HTT*, que fueron atendidos en el depto. de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN). Previo consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética del Instituto (Apéndice 1).

### **6.2.1 Criterios de inclusión.**

- Pacientes que presenten fenotipo de EH (evaluado previamente en la clínica de movimientos anormales por neurólogos expertos, evaluación psiquiátrica y que asistan a la consulta de neurogenética) y que haya resultado negativo para el análisis molecular de EH.
- Que el paciente acepte participar en el estudio y firme carta de consentimiento informado.
- Que el paciente sea mestizo mexicano (de acuerdo con la definición antropológica un mestizo mexicano es aquel individuo con tres generaciones nacidas en México; es decir, de padres y abuelos nacidos en México. Puede aceptarse solo un abuelo español).

### **6.2.2 Criterios de exclusión.**

- Que el paciente no sea mexicano o que más de uno de sus abuelos no lo fueran.
- Que el individuo presente expandidos del trinucleótido CAG (>36) en el gen *HTT*.
- Que el individuo no aceptara participar en el estudio.

### **6.3 Toma de muestra.**

De cada paciente se obtuvieron 6 mL de sangre periférica mediante venopunción en tubos *Vacutainer* con citrato de sodio como aditivo anticoagulante. Las muestras fueron preservadas a 4°C hasta el momento de su uso.

#### **6.4 Extracción de DNA genómico por el método de sales-cloroformo.**

1. En un tubo Falcon de 15 mL se transfirieron 3 mL de sangre periférica, se agregaron 9 mL de amortiguador de lisis de glóbulos rojos (BLGR) (cloruro de amonio 0.155M, bicarbonato de potasio 10mM, EDTA 0.1mM, pH 7.4) y se homogenizó por inversión.
2. El sobrenadante se centrifugó a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 6 minutos a 4°C. Se decantó, conservando el botón.
3. El botón se resuspendió en 1 mL de BLGR y se transfirió a dos tubos Eppendorf de 1.5 mL.
4. La mezcla se centrifugó a 3,000 rpm durante 2 minutos y se decantó. Este procedimiento se repitió cuatro veces hasta obtenerse un botón blanco, libre de glóbulos rojos.
5. Al botón se agregó 570 µL de NaCl [5 mM], 40 µL de SDS [10%] y 200 µL de solución saturada de NaCl [7M], homogenizado entre cada uno.
6. La mezcla se centrifugó a 11,500 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL.
7. Al sobrenadante se le agregó 700 µL de Cloroformo:Alcohol isoamílico (proporción 29:1) y se homogenizó.
8. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo de 1.5 mL.
9. Al sobrenadante se le añadió 900 µL de etanol absoluto frío y se homogenizó.
10. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos para descartar el sobrenadante.
11. Al botón se agregó 700 µL de etanol al 70%, frío y se agitó. Esto con la finalidad de quitar residuos de etanol absoluto.

12. Los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. El botón resultante fue secado en un concentrador al vacío durante aproximadamente 20 minutos, a temperatura ambiente.

13. El botón seco se disolvió en 300 µL de agua estéril y se mantuvo a 60°C durante 2 horas con agitación constante para disolverlo completamente y cuantificar su concentración y calidad.

Este método elimina los glóbulos rojos, carentes de material genético nuclear, para posteriormente lisar las células blancas que sí lo tienen. Posteriormente se eliminan impurezas como proteínas y restos celulares mediante centrifugación diferencial y se precipita el DNA por su característica insolubilidad en alcoholes.

### **6.5 Análisis de integridad de DNA.**

Para llevar a cabo el análisis de integridad del DNA se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los pasos para realizar este proceso fueron:

- Elaboración del gel:
  1. Los geles se prepararon añadiendo 1g de agarosa por cada 100 mL de amortiguador de Sodio Borato (SB) 1X. Las concentraciones del *stock* se detallan en el Apéndice 2.
  2. La mezcla se calentó, se agregó 1 µL del colorante bromuro de etidio (1 µL de colorante por cada 100 mL de solución) y se homogenizó.
  3. La mezcla anterior se depositó dentro de un portagel y se dejó polimerizar por una hora.

- Realización de la electroforesis:
  1. El gel se colocó sobre una cámara de electroforesis horizontal y se agregó amortiguador SB 1X hasta cubrir por completo el gel.
  2. Alícuotas de 3.0  $\mu\text{L}$  de muestra se mezclaron con 2.0  $\mu\text{L}$  de colorante de carga (azul de bromofenol).
  3. La mezcla anterior se depositó sobre un pozo de gel. Se tomó 1 $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (100bp *ladder* de la casa comercial Invitrogen) y se depositó en un pozo del gel.
  4. La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder y se aplicó una corriente eléctrica de 100 V durante aproximadamente 90 minutos.
  5. El gel se colocó en un transiluminador de luz UV para su análisis, además se tomó una fotografía con un fotodocumentador para el uso práctico de la imagen obtenida.

## 6.6 Cuantificación de DNA.

La concentración de DNA de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría en un equipo *NanoDrop 2000*. La concentración fue obtenida por su lectura de absorbancia a 260 nm. Por su parte, la pureza de las muestras fue determinada por la relación  $A_{260}/A_{280}$ , lo que nos indica la calidad de la extracción realizada ya que hace una relación entre el DNA y algunas proteínas que puedan estar en la muestra. Esta determinación se basa en que las bases nitrogenadas del DNA tienen un máximo de absorción de 260 nm y aminoácidos aromáticos como el triptófano y la tirosina absorben radiación a 280 nm.

Para la determinación se ajustó el blanco con agua y se eligió el programa de cuantificación de DNA de doble cadena. Para cada cuantificación se utilizó un volumen de 1.5  $\mu\text{L}$  de la muestra disuelta, previamente homogenizada mediante agitación a 40°C y 850 rpm en equipo *Thermomixer*. Posteriormente se realizaron diluciones de las muestras a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{L}$  y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

## 6.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La región de interés de cada gen se amplificó mediante la técnica molecular de PCR de punto final, empleando oligonucleótidos que flanquearan estas regiones. La secuencia de los oligonucleótidos empleados para cada uno de los genes se presenta entre los reactivos en el Apéndice 2. La Tabla 3 muestra los reactivos utilizados en la PCR, así como la concentración y el volumen necesario para realizar cada una de las reacciones.

**Tabla 3.** Reactivos y concentraciones utilizados en la mezcla de reacción de la PCR.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen</b>
DNA	100 ng/ $\mu$ L	3 $\mu$ L
Primer Forward	25 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Primer Reverse	25 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Master mix	10X	10 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	-	10 $\mu$ L
Volumen final de reacción	-	25 $\mu$ L

Las condiciones de reacción utilizadas para la PCR fueron previamente estandarizadas mediante un gradiente de temperatura para cada uno de los genes, obteniéndose los resultados óptimos de temperaturas y ciclos presentados en las Tablas 4-8.

**Tabla 4.** Condiciones de la PCR gen *TBP*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	1 min
Alineación	55°C	1 min
Extensión	72°C	2 min
Extensión final	72°C	10 min
Conservación	4°C	∞

**Repetir 35 ciclos**

**Tabla 5.** Condiciones de la PCR gen *JPH3*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 min
Desnaturalización	94°C	20s
Alineación	60°C	30 s
Extensión	72°C	30 s
Extensión final	72°C	5 min
Conservación	4°C	∞

**Repetir 32 ciclos**

**Tabla 6.** Condiciones de la PCR gen *PRNP*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	10 min
Desnaturalización	94°C	1 min
Alineación	56°C	1 min
Extensión	72°C	2 min
Extensión final	72°C	5 min
Conservación	4°C	∞

**Repetir 30 ciclos**

**Tabla 7.** Condiciones de la PCR gen *ATN1*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 min
Desnaturalización	94°C	20 s
Alineación	69°C	30 s
Extensión	72°C	1.5 min
Extensión final	72°C	10 min
Conservación	4°C	∞



**Tabla 8.** Condiciones de la PCR gen *FTL*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 min
Desnaturalización	94°C	20 s
Alineación	62°C	30 s
Extensión	72°C	1 min
Extensión final	72°C	10 min
Conservación	4°C	∞



## 6.8 Resolución de productos de PCR.

Para determinar el tamaño de los productos de la PCR esperados para cada uno de los genes, los productos fueron resueltos en geles de agarosa (2.5%/SB 1X) mediante una electroforesis horizontal a 100 V durante 1 hora, empleando el marcador de peso molecular 100bp *ladder* Invitrogen para corroborar el tamaño de los productos.

En este paso se analizó la presencia de alelos expandidos para los genes *TBP*, *JPH3* y *ATN1*, además de la inserción en *PRNP*. En el caso de *FTL* únicamente el tamaño del producto.

## 6.9 Análisis de autorradiografía.

Para el gen *TBP* se adicionó a la reacción de PCR un isótopo radioactivo ( $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP) para su posterior resolución en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes. Como marcador de peso molecular se utilizó la secuencia del plásmido *pGEM* en carriles extremos, esto con la finalidad de determinar el número de trinucleótidos repetidos CAG/CAA. Una vez realizada la electroforesis a 1500V/4h los geles fueron secados mediante calor y vacío y fueron expuestos a una placa de rayos X (autorradiografía), 24 horas después las placas fueron reveladas y analizadas empleando un negatoscopio. Para determinar el número de repetidos se empleó como marcador la secuenciación del plásmido *pGEM*, el cual se colocó en ambos extremos del gel.

Este procedimiento se realizó con la finalidad de tener diferentes métodos para comparar el número de repetidos con el resultado obtenido en el análisis de fragmentos.

## 6.10 Purificación de productos de PCR.

Con el objetivo de eliminar cualquier agente contaminante se realizó la purificación de los productos de PCR, para ello se empleó el estuche comercial de purificación *QIAquick* de QIAGEN. El cual se basa en la purificación del DNA mediante su unión basada en cargas electrostáticas a una columna de sílice, la cual será posteriormente lavada con diversos amortiguadores. La metodología realizada fue la siguiente:

- a) Purificación a partir de reacción de PCR.
  1. A la muestra se le añadió 150  $\mu$ L de amortiguador de captura (PBI) y se homogenizó.
  2. La mezcla fue transferida a la columna del estuche comercial dentro de un tubo colector y se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm.
  3. El precipitado fue desechado y se añadió 500  $\mu$ L de amortiguador de lavado (PE) a la columna. Se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm.

4. El filtrado fue desechado y la columna se colocó en un tubo de reacción de 1.5 mL.
5. Al centro de la columna se le añadió 15  $\mu$ L de amortiguador de elución (EB) y se dejó reposar durante 60 s a temperatura ambiente.
6. La columna se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos y el filtrado se conservó a 4°C hasta su uso.

b) Purificación a partir de geles.

Este procedimiento se realizó para las muestras que presentaron alelos expandidos, con la finalidad de poder secuenciar ambos alelos. Para esto se cortaron las bandas amplificadas por PCR directamente del gel.

1. Las bandas del gel fueron cortadas y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se añadieron 400  $\mu$ L de amortiguador de disolución (QG) y se incubó a 50°C durante 20 minutos con agitación constante.
2. Con el gel ya disuelto, se añadieron 150  $\mu$ L de Isopropanol absoluto a la mezcla y se homogenizó.
3. La mezcla se transfirió a la columna del estuche comercial dentro de un tubo colector y se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm.
4. El precipitado fue desechado y se añadieron 500  $\mu$ L de amortiguador de lavado (PE) a la columna. Se centrifugó durante un minuto a 13,000 rpm.
5. El precipitado fue desechado y la columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
6. Al centro de la columna se le añadieron 15  $\mu$ L de amortiguador de elución (EB) y se dejó reposar durante 60 s a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min y el filtrado se conservó a 4°C hasta su uso.

### 6.11 Reacción de secuenciación.

Una vez que los productos de PCR fueron purificados las muestras pudieron ser sometidas a reacción de secuenciación. Se empleó el estuche comercial de secuenciación *Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* de *Applied Biosystems*. Los reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados para llevar a cabo la reacción se resumen en la Tabla 9, mientras que la Tabla 10 resume las condiciones necesarias de temperatura.

**Tabla 9.** Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Volumen
Primer Forward	25 ng/μL	1 μL
Amortiguador	5X	3.5 μL
Big Dye		1 μL
H2O libre de RNAsas		12.5 μL
Producto de PCR	~100ng/μL	2 μL
Volumen final de reacción		20 μL

**Tabla 10.** Condiciones de reacción de secuenciación.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96°C	30 s
Desnaturalización	95°C	30 s
Alineación	50°C	10 s
Extensión	60°C	4 min
Extensión final	72°C	60 s
Conservación	4°C	∞

**Repetir 25 ciclos**

## 6.12 Purificación de productos de reacción de secuenciación.

Una vez realizada la reacción de secuencia se eliminó el exceso de oligonucleótidos y del terminador (*Big Dye*) mediante purificación de los productos de secuenciación utilizando columnas de purificación *Centri-Sep* (*Life Technologies*), esto con la finalidad de eliminar cualquier agente que pueda fungir como contaminante durante la secuenciación. Para esto se realizó lo siguiente:

- Preparación de las columnas:
  1. A cada columna se les agregaron 750  $\mu$ L de agua estéril para hidratarlas y posteriormente se homogeneizaron.
  2. Las columnas fueron conservadas a 4°C durante dos horas.
  3. Las tapas fueron removidas y se introdujo la columna en un tubo colector. Se centrifugó a 3,000 rpm durante un minuto.
- Purificación de las muestras:
  1. La reacción de secuencia fue aplicada en la columna.
  2. La columna se centrifugó sobre un tubo de reacción de 1.5 mL.
  3. El filtrado fue concentrado a sequedad en un concentrador de vacío.

## 6.13 Secuenciación automatizada tipo Sanger.

El producto purificado se resuspendió en 15  $\mu$ L de formamida ultrapura y se transfirió a una placa de secuencia de 96 pozos. Se desnaturalizó a 96°C durante 5 minutos y se analizó en un secuenciador de DNA automatizado modelo ABIPRISM 3130 (*Applied Biosystems*).

## 6.14 Análisis de electroferogramas.

Una vez que se obtuvieron los electroferogramas se realizó su análisis bioinformático empleando el software Sequencing Analysis v.5.3.

## 6.15 Análisis de fragmentos.

Una vez obtenidas las secuencias se estandarizó una técnica de análisis de fragmentos para el estudio de SCA17 y que posteriormente servirá para otro tipo de SCAs.

La amplificación de la región de interés del gen *TBP*, también se hizo con la técnica molecular de PCR de punto final incorporando un oligonucleótido marcado con el fluoróforo 6FAM (los reactivos empleados y las cantidades se muestran en la Tabla 11, mientras que las condiciones para la PCR se presentan en la Tabla 12), de esta manera todos los productos generados portaron el fluoróforo. Para esta prueba se analizó un individuo sano como control negativo y una muestra positiva para la mutación de interés, con la finalidad de comparar el resultado del análisis.

**Tabla 11.** Reactivos utilizados en la reacción de PCR para análisis de fragmentos.

Reactivo	Concentración	Volumen
DNA	100 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Primer Forward (marcado con fluoróforo 6FAM)	5.0 $\mu$ M	0.6 $\mu$ L
Primer Reverse	5.0 $\mu$ M	0.6 $\mu$ L
Master mix	10X	6 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	-	1.8 $\mu$ L
Volumen final de reacción	-	10 $\mu$ L

**Tabla 12.** Condiciones de la PCR para el análisis de fragmentos del gen *TBP*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	15 min
Desnaturalización	94°C	20 s
Alineación	58°C	30 s
Extensión	72°C	1.5 min
Extensión final	72°C	10 min
Conservación	4°C	$\infty$

**Repetir 35 ciclos**

Los productos obtenidos fueron transferidos a una placa de secuencia de 96 pozos, en cada pozo se agregó 1  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 0.5  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular 500 LIZ (*Applied Biosystems*) y 8.5  $\mu\text{L}$  de formamida ultrapura.

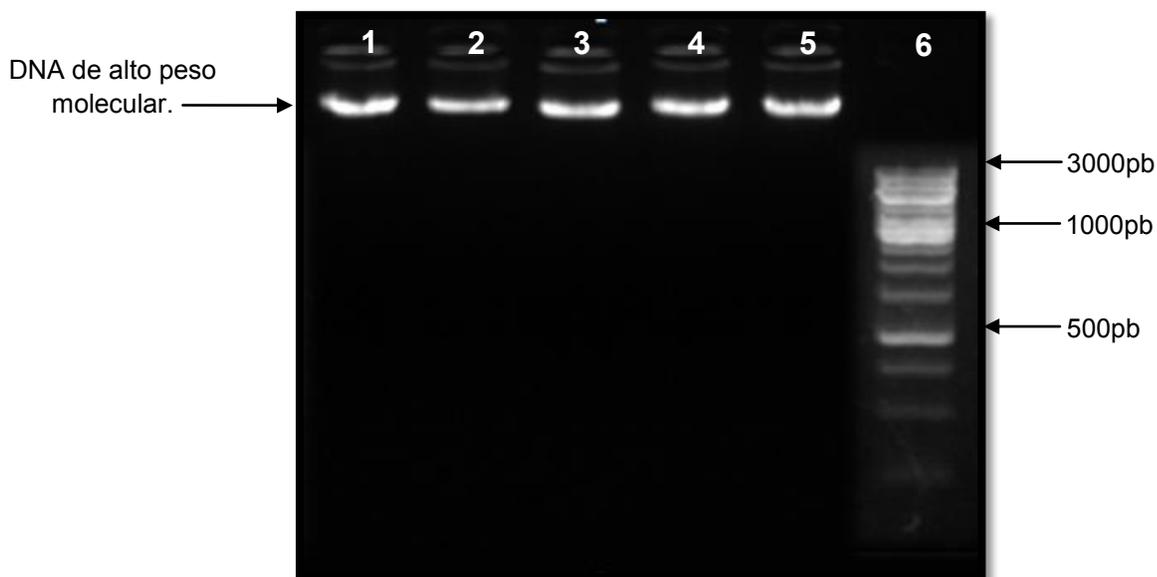
El amplicón fue analizado mediante electroforesis capilar en un secuenciador automatizado ABIPRISM3130 (*Applied Biosystems*), el cual identificó la presencia de los productos al pasar por un detector y realizó un cálculo del tamaño de éste al compararlo con un marcador estandar de peso molecular (GeneScan 500 LIZ dye Size Standard) el cual se emplea a manera de un estandar de dimensión de los fragmentos de DNA (de 35 a 500 nucleotidos), de ese modo esta técnica compara el tamaño del fragmento amplificado por PCR con el marcador de peso molecular, obteniendo el tamaño de los productos expresado en pares de bases (pb). Posteriormente se analiza el resultado de los fragmentos y se realiza una ecuación (en donde al total de pares de bases se les resta el número de bases de ambos oligonucleótidos y las bases que están antes de llegar al primer trinucleótido repetido; posteriormente ese número se divide entre tres) para determinar el número de repetidos para cada alelo. En este caso la ecuación para obtener el número de repetidos fue:  $(\# \text{ de pb} - 95)/3 = \text{número de repetidos}$ .

## 7. Resultados.

El banco de DNA de la Enfermedad de Huntington en el INNN consta de un total de 1521 muestras (hasta marzo de 2014), en este contexto el 6.7% de los pacientes (las 102 muestras estudiadas) resultó como fenocopias de la EH. En este trabajo analizamos un total de 102 muestras (40 hombres y 62 mujeres, con un rango de edades de 25 a 74 años, siendo 42 la edad promedio) las cuales fueron previamente tamizadas para EH y seleccionadas solo las muestras negativas a la mutación.

### 7.1 Análisis de integridad de DNA.

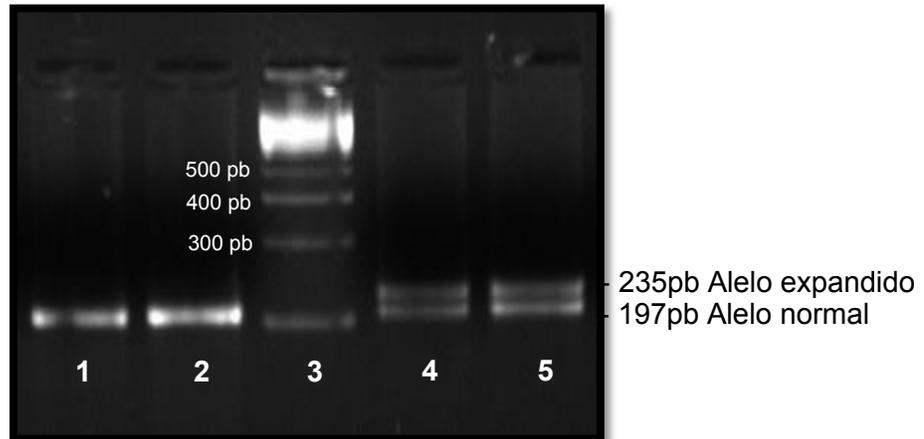
El DNA genómico fue íntegro y con un alto peso molecular, tal como lo ilustra la Figura 8, que muestra el resultado de la electroforesis horizontal del DNA en un gel de agarosa al 1% en SB al 1%. Se observa una banda única debido a que es DNA (genómico) de alto peso molecular, no se aprecia la presencia de DNA degradado o de bajo peso molecular.



**Figura 8.** Integridad del DNA genómico. Resolución de DNA genómico en gel de agarosa al 1%. En los carriles 1-5 se observan muestras diferentes de DNA genómico, mientras que en el carril 6 se observa el marcador de peso molecular 100pb Ladder (Invitrogen).

## 7.2 Análisis de *TBP*/SCA17.

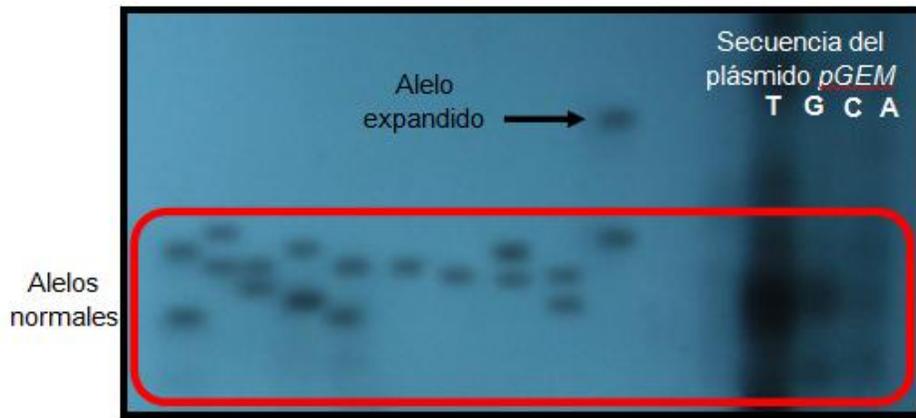
Se realizó un tamizaje del exón 4 del gen *TBP*, debido a que este exón contiene el repetido CAG/CAA. El análisis de los productos de PCR en geles de agarosa mostró un paciente con un alelo expandido para este gen (Figura 9).



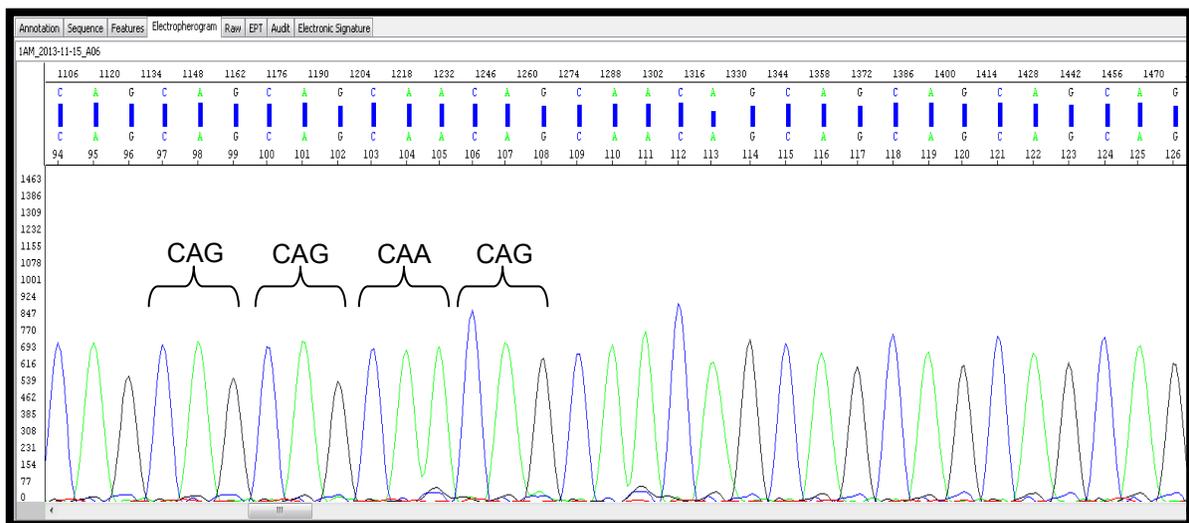
**Figura 9.** Resolución de productos de PCR de SCA17/HDL4 (gen *TBP*). Gel de agarosa al 2.5%. En los carriles 1, 2 se observan dos productos de muestras con alelos normales sin expandidos (control negativo), en el carril 3 se observa el marcador de peso molecular 100pb *ladder* (Invitrogen), en el carril 4 se observa un paciente con SCA17 (control positivo), y en el carril 5 el producto del paciente positivo al expandido en este estudio.

El tamizaje en gel de agarosa solo permite identificar alelos normales y expandidos, sin embargo no se puede determinar el número de repetidos, por lo que fue necesario realizar la PCR con incorporación del nucleótido radioactivo para obtener una autorradiografía y de este modo determinar el número de repetidos. El análisis de la autorradiografía del paciente con el alelo expandido (Figura 10) mostró que efectivamente se trata de un alelo mutado con un número de repetidos de 43 y uno normal de 37 CAG lo cual se considera un diagnóstico molecular positivo para SCA17 ó HDL4.

Este resultado se confirmó mediante secuenciación automatizada (Figura 11), en donde se obtuvo un número de repetidos de:  $(CAG)_{43} (CAA)_{35}/(CAG)_{37} (CAA)_{29}$ , para los alelos mutado y normal, respectivamente.

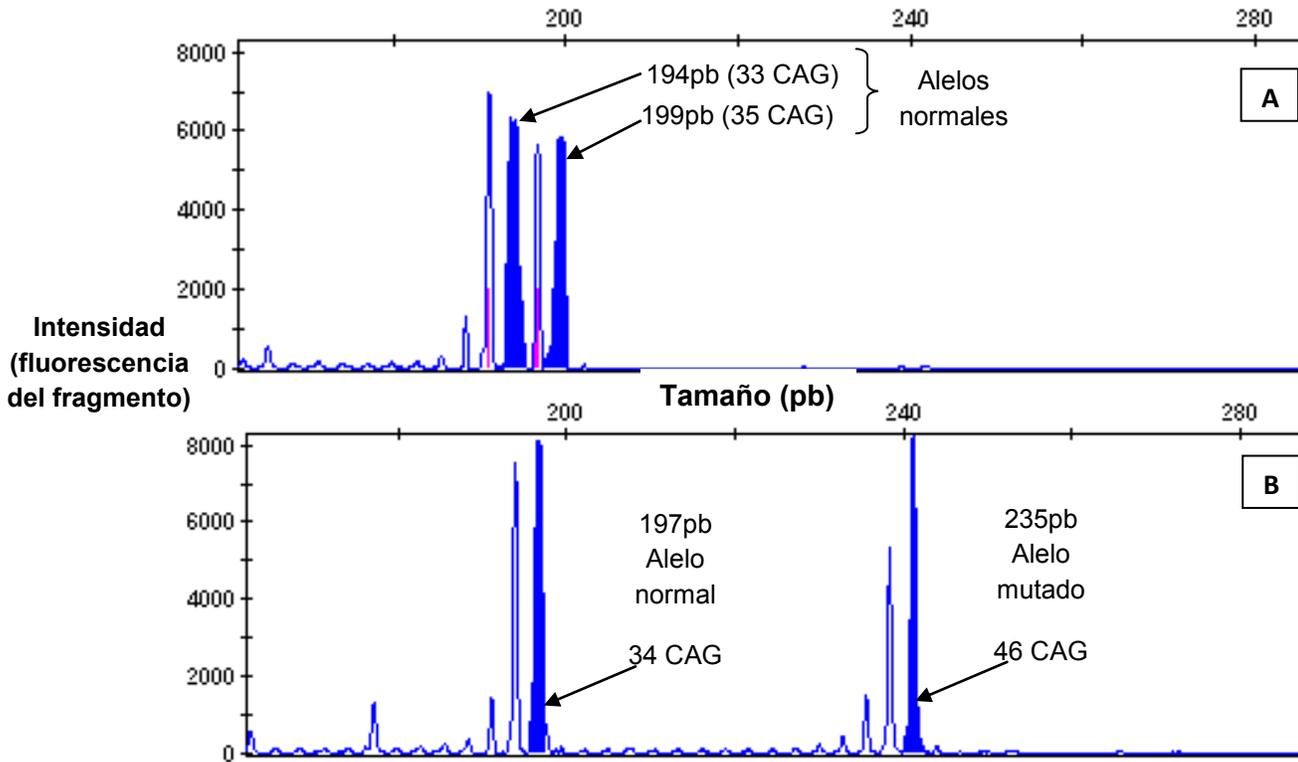


**Figura 10.** Autorradiografía de gel de poliacrilamida al 6%, donde se observan los alelos normales (dentro de cuadro rojo) y el paciente con el alelo expandido (señalado con una flecha).



**Figura 12.** Electroferograma parcial de paciente con alelo expandido en *TBP*, donde se observa el repetido CAG con los interrumpidos CAA.

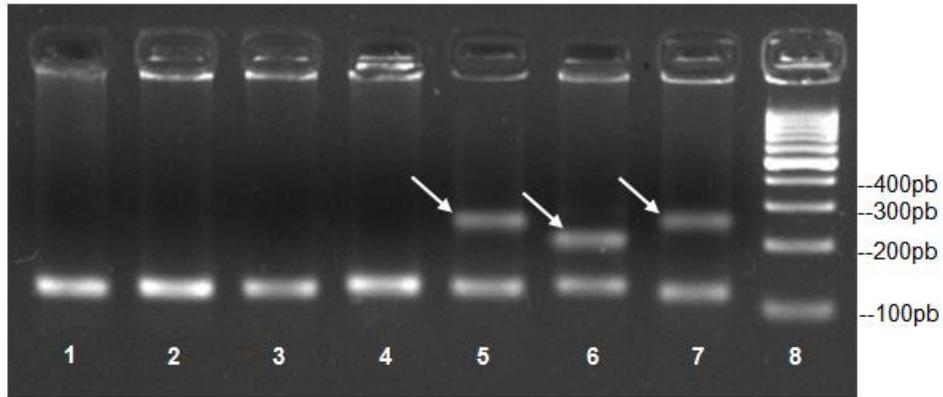
Una vez obtenido el número de repetidos por autorradiografía y secuenciación automatizada se realizó el análisis de fragmentos de DNA, el cual mostró dos alelos con una longitud de 235 y 197 pares de bases (Figura 12), de esta forma el número de repetidos por análisis de fragmentos fue de 46/34 CAG/CAA; cifra muy similar a lo obtenido mediante las técnicas anteriormente mencionadas.



**Figura12.** Análisis de fragmentos de un individuo sano como control negativo (A), y de paciente HDL positivo para SCA17 (B). Los picos sombreados en azul representan los alelos amplificados para la región de interés del gen *TBP*, en la figura A el control negativo muestra fragmentos con longitudes de 199 y 194 pb, lo que le confiere alelos con 35 y 33 repetidos CAG respectivamente. En la figura B se analizó el paciente HDL que resultó positivo en este estudio, el cual presentó fragmentos de 235 y 197 pb, lo que le confiere alelos con 46 y 34 repetidos CAG respectivamente.

### 7.3 Análisis de *JPH3*.

El análisis de los productos de PCR del gen *JPH3* mostró varios pacientes con expansión del repetido CTG (Figura 13), estas muestras fueron purificadas directamente del gel y sometidas a secuenciación. Los electroferogramas de estas muestras (Figura 14) confirmaron la expansión mostrando un total de ocho pacientes pertenecientes a cinco familias con un diagnóstico molecular positivo para la HDL2 (Tabla 11).



**Figura 13.** Resolución de productos de PCR. Gel de agarosa 2.5%. En los carriles 1-4 se muestran pacientes sin el expandido CTG en el gen *JPH3*, los cuales poseen un producto de 117pb, mientras que en los carriles 5-7 se observa el alelo expandido (señalados con flechas) para algunos pacientes en este estudio. En el carril 8 se observa el marcador de peso molecular 100pb Gene ladder (*Fermentas*).

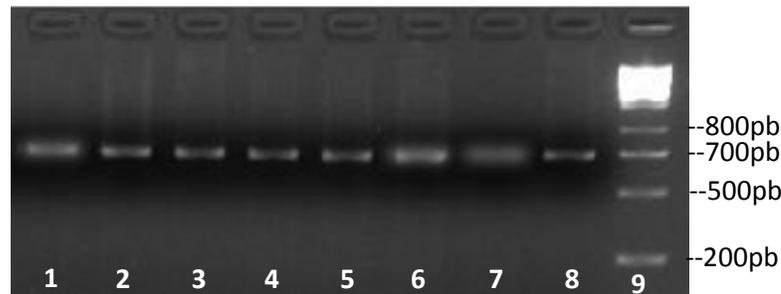
**Tabla 13.** Pacientes con mutación en *JPH3*.

Paciente	Género	Expansión de trinucleótido repetido
1	Masculino	47/25
2	Femenino	43/24
3	Femenino	44/22
4	Femenino	53/23
5	Femenino	42/21
6	Femenino	45/23
7	Masculino	42/24
8	Femenino	48/22



#### 7.4 Análisis de *PRNP*.

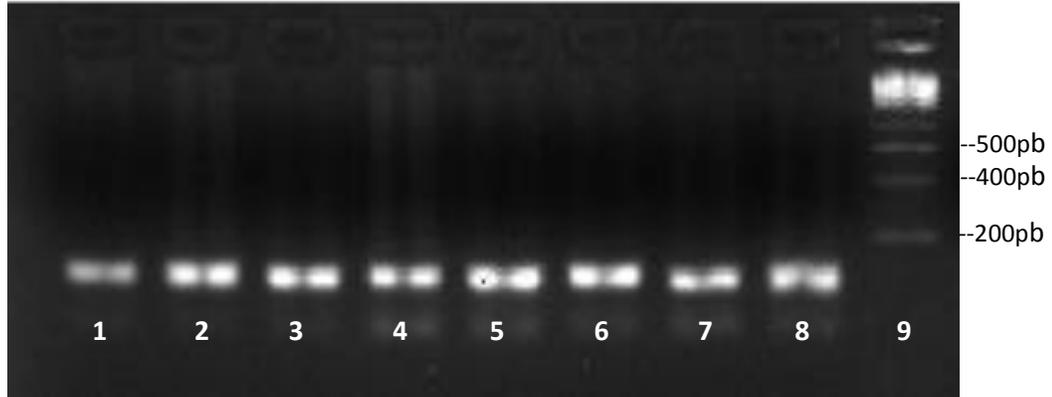
La resolución de los productos de PCR del gen *PRNP* en geles de agarosa (Figura 16), no mostró doubles bandas las cuales son indicativas de la presencia de la inserción de 192 pb en la región de octapéptidos repetidos, sin embargo se secuenciaron el 20% de las muestras para corroborar la ausencia de la mutación y efectivamente en ninguna se observaron anomalías en la secuencia del gen.



**Figura 16.** Resolución de productos de PCR. Gel de agarosa 2.5%. En los carriles 1-8 se observan las bandas de 738 pb correspondientes al exón 2 de *PRNP*, en el carril 9 se observa el marcador de peso molecular 100pb ladder (Invitrogen).

#### 7.5 Análisis de *ATN1*.

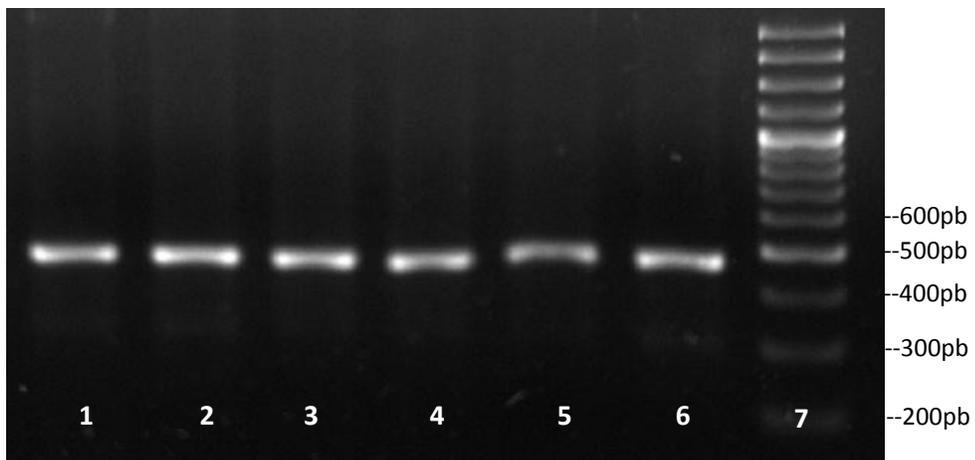
En la búsqueda de alelos expandidos del trinucleótido repetido CAG en el gen *ATN1* no se encontró en ninguno de los 93 pacientes restantes. La resolución de productos de PCR en geles de agarosa no mostró bandas sugestivas al tamaño del expandido en este gen (Figura 17), todas las bandas resultaron de un tamaño correspondiente a alelos normales. De igual manera el 20% de las muestras fueron sometidas a secuenciación automatizada para corroborar la ausencia de mutaciones, en todas las muestras secuenciadas el número de alelos fue menor a 30 repetidos CAG, lo que nos indica que estos están dentro del rango de alelos normales.



**Figura 17.** Resolución de productos de PCR. Gel de agarosa 2.5%. En los carriles 1-8 se presentan muestras correspondientes a pacientes HDL que resultaron negativos al expandido CAG en el gen *ATN1* (productos de 140pb). En el carril 9 se observa el marcador de peso molecular 200pb ladder (Fermentas).

### 7.6 Análisis de *FTL*.

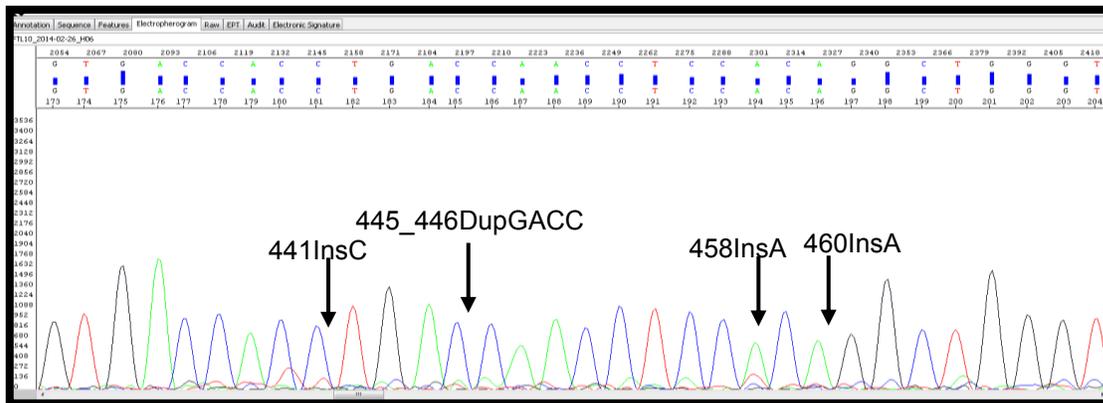
Para el análisis del gen *FTL*, los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 2.5% (Figura 18) únicamente con la finalidad de comprobar la amplificación, corroborar la integridad y tamaño de la muestra, debido a que las mutaciones en este gen únicamente son inserciones y deleciones, por lo que las 93 muestras restantes fueron sometidas a secuenciación automatizada tipo Sanger.



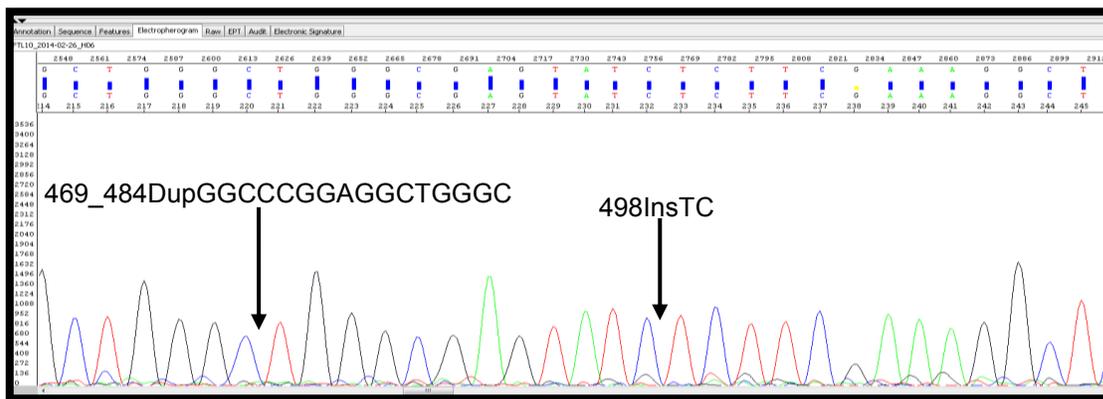
**Figura 18.** Resolución de productos de PCR del gen *FTL* (productos de 471pb). Gel de agarosa 2.5%. En los carriles 1-6 se presentan muestras correspondientes a pacientes con fenotipo HDL, en el carril 7 se observa el marcador de peso molecular 100pb ladder (Invitrogen).

Se amplificó el exón 4 de este gen debido a que es el que contiene todas las mutaciones reportadas para neuroferritinopatías, las mutaciones que se buscaron en las secuencias fueron: 441InsC; 445\_446DupGACC; 458InsA (Figura 19); 460InsA; 469\_484DupGGCCCGGAGGCTGGGC; 498InsTC (Figura 20), debido a que estas mutaciones presentes en el exón 4 son las relacionadas al fenotipo clínico de EH.

En ninguno de los electroferogramas se encontró alguna de las seis mutaciones buscadas, por lo cual la neuroferritinopatía queda descartada para el diagnóstico molecular de estos pacientes.



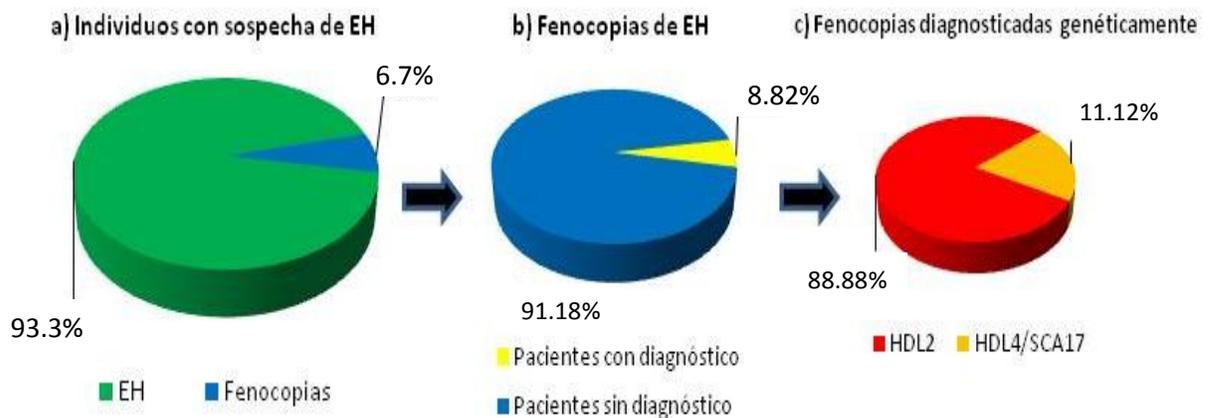
**Figura 19.** Electroferograma parcial de *FTL*, donde se marcan las mutaciones que se buscaron en el exón 4 de este gen.



**Figura 20.** Electroferograma parcial de *FTL*, donde se marcan las mutaciones que se buscaron en el exón 4 de este gen.

## 7.6 Fenocopias identificadas.

De los 102 pacientes analizados 9 pacientes fueron positivos para HDL, sin embargo no se encontraron mutaciones en los genes *PRNP*, *ATN1* y *FTL*. Se determinó el diagnóstico molecular para un total de nueve pacientes (8.82%), encontrando un paciente (1%) con SCA17/HDL4, mientras que para ocho pacientes pertenecientes a cinco familias se determinó un diagnóstico de HDL2 (4.90%). No se encontraron pacientes para las otras enfermedades, por lo que 93 pacientes (91.18%) aún quedan sin diagnóstico (Figura 21).



**Figura 21.** Frecuencias relativas de a) Individuos que resultan como fenocopias de la EH y casos positivos para EH, b) Fenocopias diagnosticadas y no diagnosticadas, y c) Enfermedades diagnosticadas genéticamente.

Actualmente el banco de Enfermedad de Huntington del INNN consta de un total de 1521 muestras, sin embargo, de esas muestras el 6.7% resultan como fenocopias de EH. En todos los pacientes predominó un cuadro clínico de movimientos coreicos y demencia lo que sugirió un fenotipo de EH.

En la Tabla 14 se resumen algunas características de los pacientes de este estudio en los cuales se encontraron mutaciones.

**Tabla 14.** Mutaciones encontradas en pacientes HDL.

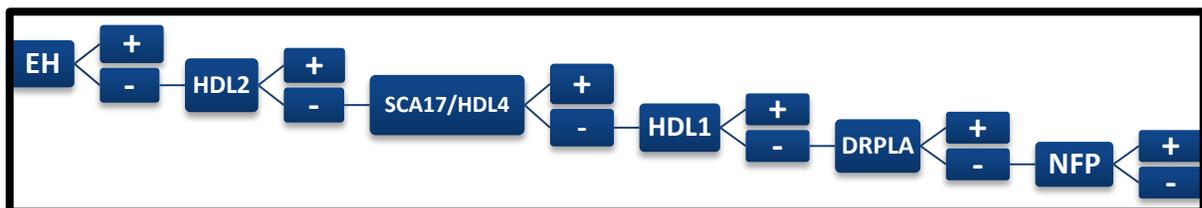
Paciente	Género	Gen mutado	Diagnóstico molecular	Mutación	Expansión de trinucleótido repetido	Familia
1	Femenino	<i>TBP</i>	SCA17/HDL4	Expansión CAG/CAA	47/35	1
2	Masculino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	47/25	2
3	Femenino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	44/22	2
4	Masculino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	42/24	2
5	Femenino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	48/22	2
6	Femenino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	43/24	3
7	Femenino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	53/26	4
8	Femenino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	42/21	5
9	Femenino	<i>JPH3</i>	HDL2	Expansión CTG	45/23	6

Por otro lado, en la Tabla 15 se presentan las características clínicas de estos pacientes (correlación genotipo-fenotipo) las cuales pudieron haber presentado el traslape clínico con la EH, en donde los pacientes positivos a mutación provienen de los estados de Guerrero, Oaxaca (para HDL2) y Estado de México (para HDL4), en cuanto a características que pudieron haber ocasionado el traslape con la EH se encuentran la edad de inicio, ya que en todos los casos fue después de la tercera década de la vida, la presencia de movimientos coreicos, alteraciones psiquiátricas como demencia, depresión, agresividad e ideación suicida. La ataxia también se hizo presente en todos los casos, junto con distonía, movimientos oculares anormales, hiperreflexia y disartria. Estos síntomas

característicos de la EH se hicieron presentes en los pacientes HDL estudiados en el presente trabajo, lo que pudo haber sido la causa del traslapamiento clínico. Con base a los resultados obtenidos se realizó un algoritmo diagnóstico (Figura 22) que servirá como estrategia para el análisis de pacientes que resulten negativos a mutaciones en el gen *HTT* pero que presenten un fenotipo clásico de EH. Los detalles del algoritmo son analizados posteriormente en la discusión.

**Tabla 15.** Características clínicas de pacientes HDL con mutaciones encontradas.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR		HDL 2 (n) %	HDL4 (n) %
GENERO	Femenino	(6/8) 75 %	100 %
	Masculino	(2/8) 25 %	
ORIGEN	Guerrero	(7/8) 87.5 %	
	Oaxaca	(1/8) 12.5 %	
	Edo. Méx.		100 %
LINEA DE HERENCIA	Materna	(5/8) 62.5 %	(1) 100%
	Paterna	(1/5) 12.5 %	
EDAD DE INICIO		39.2 años	40.0 años
COREA		(8) 100%	(1) 100%
DISTONIA		(3/8) 37.5 %	(1) 100%
DEMENCIA		( 8/8) 100%	(1) 100%
PSIQUIÁTRICOS	Depresión	(7/8) 87.5%	(1) 100%
	Agresividad	(7/8) 87.5%	
	Ideación suicida	(5/8) 62.5 %	
CEREBELO (ATAXIA)		(7/8) 87.5 %	(1) 100%
MOV.OCULARES		(2/8) 25.0 %	(1) 100%
HIPERREFLEXIA		(5/8) 87.5 %	(1) 100%
LENGUAJE (DISARTRIA)		(5/8) 87.5 %	(1) 100%



**Figura 22.** Algoritmo diagnóstico para el análisis de fenocopias de la EH.

## *8. Discusión.*

El análisis molecular de cinco genes diferentes en 102 pacientes referidos por sospecha de EH sin mutación en el gen *HTT* reveló un paciente con un número anormal de repetidos CAG/CAA en el gen *TBP*, ocho pacientes con un expandido CTG >40 en *JPH3* y ningún caso positivo para mutaciones en *PRNP*, *ATN1* y *FTL*.

Las mutaciones en *TBP* son responsables de la SCA17/HDL4, la cual presenta un traslapamiento clínico con la EH ya que ambos presentan un cuadro clínico de corea, demencia y alteraciones psiquiátricas, por lo cual las expansiones CAG/CAA en el gen *TBP* representa la causa monogénica más común de los fenotipos HDL en algunas poblaciones Caucásicas (Bauer *et al.*, 2004).

Sin embargo en este estudio SCA17 no fue la causa más común para los fenotipos HDL, ya que solo se identificó un paciente con 43 repetidos en *TBP*, considerando que el rango patológico para esta mutación va de 43-63 repetidos, este paciente se encuentra dentro del rango de alelos patológicos para dicha enfermedad (Stevanin *et al.*, 2003). El paciente positivo para SCA17 corresponde al género femenino y no presentó antecedentes familiares de EH sin embargo presenta una historia familiar de ataxia espinocerebelosa, presentando una tía (hermana del padre) afectada; lo cual nos puede sugerir algún tipo de sesgo durante la valoración clínica (errores al momento de valorar la historia familiar), esta paciente fue incluida dentro del grupo de estudio debido a que su forma familiar para SCA17 no está descrita como criterio de exclusión (solo aquellos casos con formas familiares de EH). Actualmente para esta enfermedad neurodegenerativa se consideran dos procesos evolutivos implicados en el proceso del tamaño de los microsatélites (expansión del trinucleótido repetido CAG/CAA), estos procesos son: Un deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del DNA, que da como resultado un apareamiento erróneo de las hebras replicadas, y cambios en la recombinación, tales como un cruce desigual o mutación de genes. Se sugiere que esta región de microsatélites presenta un deslizamiento que incluye de 4-8 repetidos, sin embargo se asume que los interrumpidos CAA en este gen confieren un efecto estabilizador al mismo gen

*TBP*. Estos interrumpidos se encuentran presentes en todos los primates y pueden prevenir el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación, aunque si el número de repetidos CAG aumenta, el microsatélite se desestabiliza conduciendo a una expansión patológica, como es el caso del paciente en este estudio (Tomiuk *et al.*, 2007).

SCA17/HDL4 tuvo una ocurrencia del 1% en los fenotipos HDL para población mexicana, de acuerdo a este estudio; esta es una enfermedad rara, que ocurre cerca del 0-1% de todos los casos de ataxias familiares en diversas poblaciones (como Estados Unidos, Japón e Italia) y del 1-3% en los pacientes con fenotipo HDL para población mexicana (Alonso *et al.*, 2007).

Se encontró un total de ocho pacientes positivos para la expansión CTG en el gen *JPH3*, causante de la HDL2, con un rango que va de los 36 a los 53 repetidos. Esta enfermedad fue la causa más común de las fenocopias de la EH. Esta ocurrencia coincide con otras poblaciones donde HDL2 ha sido la HDL más común, por ejemplo Brasil, que al igual que México es un país Latinoamericano (Riccioppo *et al.*, 2008). Otro país que presenta a HDL2 como la fenocopia más común es Venezuela, además de encontrar familias con HDL2 reportaron a SCA2 y SCA3 como fenocopias de la EH, sin encontrar casos positivos para HDL1 y HDL4 (Paradisi *et al.*, 2013).

La mayoría de las enfermedades que presentan segmentos poliQ han sido transmitidas a los mexicanos por los españoles durante la conquista, sin embargo la HDL2 se excluye de este grupo. En estudios de ancestría realizados en caucásicos no encontró evidencia para el origen de la mutación causante de la HDL2, específicamente en población española (Bauer *et al.*, 2002). En otros estudios realizados en población caucásica encontraron un paciente con HDL2, sin embargo, este presentó un haplotipo de origen africano, lo que indica el origen de este tipo de mutación, además de la migración de los esclavos africanos a diferentes partes del mundo. En este contexto sería indispensable realizar un análisis de ancestría para la familia afectada en este estudio, con la finalidad de encontrar el origen de la mutación en la familia (Rodrigues *et al.*, 2009). Por lo tanto, la importancia del diagnóstico de HDL2 en pacientes HDL de varias etnias

debe llevarse a cabo debido a la alta tasa de recombinación entre poblaciones (Santos *et al.*, 2008).

La incidencia de la HDL2 es rara en Norte América, sin embargo su presencia en México puede ser atribuida a que las costas de Guerrero actualmente y durante muchos años, han sido puertos de entrada al país. Esta enfermedad puede tener una frecuencia de 0-15% en pacientes norteamericanos con HDL (Margolis *et al.*, 2004). En este estudio la frecuencia de HDL2 fue de 4.90% para población analizada.

En ningún paciente se presentó la inserción en la región de octapéptido repetidos, mutación que se presenta en el gen *PRNP*, lo cual nos corrobora la baja incidencia de las enfermedades priónicas (Jackson, 2014), de ese modo HDL1 en los pacientes HDL es menos frecuente para población mexicana en comparación con HDL2 y HDL4.

No se encontraron casos positivos para expansiones CAG en el gen *ATN1*, causante de la DRPLA, sin embargo esta puede llegar a presentar el mismo cuadro clínico que la EH (Kasahata & Iwasaki, 2010) y estar presente en población Latina, ya que a pesar de la ancestría de esta enfermedad (origen Japonés) se ha reportado el caso de dos familias de origen venezolano con fenotipo de EH que resultaron positivos para DRPLA (Paradisi *et al.*, 2013).

Por otro lado las secuencias del gen *FTL* no presentaron ninguna alteración correspondiente a las mutaciones buscadas para neuroferritinopatía, sin embargo, es importante considerar su análisis para elucidar mecanismos de patogénesis y su participación en el traslapamiento con la EH. Además se ha comprobado que la huntingtina puede estar implicada con el metabolismo de hierro, al igual que la ferritina, por lo cual pudiera existir algún tipo de interacción entre ambas proteínas cuando alguna de ellas se encuentra mutada (Curtis *et al.*, 2001); por lo que resultaría conveniente analizar la secuencia completa del gen o incluso realizar un análisis de interacción de ambas proteínas en casos de EH y HDL.

Estos resultados permitieron generar un algoritmo diagnóstico que consiste en buscar mutaciones conforme a la incidencia de casos positivos en los genes analizados en este estudio. Una vez que un paciente con fenotipo de EH resulta negativo a la expansión CAG se inicia la búsqueda de mutaciones en el gen *JPH3*,

de resultar negativo a mutación se continúa con el gen *TBP*. Si de igual forma el resultado es negativo a mutación en *TBP* se prosigue el análisis con los genes *PRNP*, *ATN1* y *FTL* (en los que no se encontraron mutaciones para este estudio), en este último caso el orden de la búsqueda de mutaciones fue basado en lo reportado en la literatura internacional.

Las características clínicas presentadas (Tabla 15) muestran que el traslapamiento de la EH con estas patologías pudo haber sido provocado por la presencia de síntomas clásicos de la EH, como corea, demencia y alteraciones psiquiátricas (presentes en los nueve pacientes que resultaron positivos para mutaciones en los genes estudiados), además de presentar otros factores que contribuyen en el traslape como el tipo de herencia (autosómico dominante), la presencia de distonía, ataxia, movimientos oculares, hiperreflexia y disartria. Otro factor que pudo haber contribuido es la edad de inicio, ya que la EH se presenta generalmente a partir de la tercera década de la vida y en los pacientes analizados el promedio de las edades de inicio fueron de 39 (para HDL2) y 40 años (para HDL4), edades muy similares a las del inicio de la EH (Gövert & Schneider, 2013).

Aunque no se encontraron casos positivos para mutaciones en *PRNP* (enfermedad HDL1), *ATN1* (DRPLA) y *FTL* (neuroferritinopatía), estos genes no deben de ser descartados de futuros análisis moleculares de fenocopias de EH ya que pudieran encontrarse presentes en esos casos. Como perspectiva se planea realizar un análisis de otros genes para los pacientes en los que no se encontraron mutaciones (y para futuros casos). Entre los genes considerados para incluirse en el análisis molecular se encuentran *ATXN2*, *ATXN3*, *VPS13A*, *ATXN1*, *TITF1* y *FXN* (el análisis se realizaría en ese mismo orden) responsables de la SCA2, SCA3, corea por acantocitosis, SCA1, corea hereditaria benigna y ataxia de Friedreich, respectivamente. Se consideraron estos genes ya que con base a lo reportado por la literatura internacional, las patologías provocadas por mutaciones en estos son las siguientes a descartar en los casos HDL (Martino *et al.*, 2013; Gövert & Schneider, 2013).

## 9. Conclusiones.

En este estudio el 6.70% de los casos referidos como EH resultaron como fenocopias de la enfermedad. En este estudio no se presentaron casos de heterogeneidad de *locus* en el grupo de pacientes. En este caso se consideran HDL si se trata de alguno de los cuatro tipos descritos, mientras que para heterogeneidad de locus se consideran los casos de mutaciones en genes con diferentes *loci* y que producen el mismo fenotipo (para este caso EH).

De los nueve pacientes positivos para HDL, la más frecuente fue HDL2 (4.90%) con ocho pacientes positivos pertenecientes a cinco familias, seguida por SCA17/HDL4 con un paciente positivo (1%). No se encontraron casos positivos para mutaciones en los genes *PRNP*, *ATN1* y *FTL*.

Con base a los resultados de este trabajo se diseñó un algoritmo para el abordaje diagnóstico de pacientes con fenotipo de EH negativos a mutaciones en el gen *HTT*. El cual permitirá la correcta identificación de la patología, reducir ciertos errores en el diagnóstico (lo cual representa un beneficio para el paciente como para el instituto), determinar el riesgo de incidencia las enfermedades estudiadas para población mexicana y proporcionar un asesoramiento genético adecuado y asertivo para el paciente con el fin de determinar los riesgos de transmisión para su descendencia, conllevándolo a un tratamiento de acorde a la patología de la que se trate.

## 10. Bibliografía.

- Alonso, E., Martínez-Ruano, L., Biase, I., Mader, C., Ochoa, A., Yescas, P., Gutiérrez, R., White, M., Ruano, L., Fragoso-Benítez, M., Ashizawa, T., Bidichandani, S. I. & Rasmussen, A. (2007). Distinct Distribution of Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxia in the Mexican Population. *Movement Disorders*, 22 (7): 1050-1053.
- Alonso, M. E., Ochoa, A., Boll, C., Sosa, A. L., Yescas, P., López, M., Macías, R., Familiar, I. & Rasmussen, A. (2009). Clinical and Genetic Characteristics of Mexican Huntington's Disease Patients. *Movement Disorders*, 24(13): 2012-2015.
- Alonso, M. E., Yescas, P., Rasmussen, A., Ochoa, A., Macías, R., Ruiz, I. & Suástegui, R. (2002). Homozygosity in Huntington's disease: New dilemma caused by molecular diagnosis. *Clinical Genetics*, 61: 437-442.
- Al-Tahan, A. Y., Divakaran, M. P., Kambouris, M., Bohlega, S., Salih, M., Ogunniyi, A. & Al-Ghanmi, H. (1999). A novel autosomal recessive "Huntington's disease-like" neurodegenerative disorder in a Saudi family. *Saudi Medicine Journal*, 20: 85-89.
- Arango-Lasprilla, J. C., Iglesias-Dorado, J. & Lopera, F. (2003). Características clínicas y neuropsicológicas de la enfermedad de Huntington: una revisión. *Revista de Neurología*, 37 (8): 758-765.
- Arroyave, P. & Riveros, M. (2006). Enfermedad de Huntington. *Universitas Médica*, 47 (2): 121-130.
- Barbeio, A. G., Levade, T., Delisle, M. B., Ghetti, B. & Vidal, R. (2010). Abnormal iron metabolism in fibroblasts from a patient with the neurodegenerative disease hereditary ferritinopathy. *Molecular Neurodegeneration*, 5 (50): 1-10.
- Bauer, I., Gencik, M., Laccone, F., Peters, H., Weber, B. H. F., Feder, E. H., Weirich, H., Morris-Rosendahl, D., Rolfs, A., Gencikova, A., Bauer, P., Wenning, G. K., Epplen, J. T., Holmes, S. E., Margolis, R. L., Ross, C. A. & Riess, O. (2002). Trinucleotide Repeat Expansions in the *junctophilin-3* Gene Are Not Found in Caucasian Patients with a Huntington's Disease-like Phenotype. *ANNALS of Neurology*, 51 (5): 662-667.
- Bauer, P., Laccone, F., Rolfs, A., Wüllner, U., Bösch, S., Peters, H., Liebscher, S., Scheible, M., Epplen, J. T., Weber, B. H. F., Holinski-Feder, E., Weirich-Schwaiger,

- H., Morris-Rosendahl, D. J., Andrich, J. & Riess, O. (2004). Trinucleotide repeat expansion in SCA17/TBP in white patients with Huntington's disease-like phenotype. *Journal of Medical Genetics*, 41: 230-232.
- Bech, S., Petersen, T., Norremolle, A., Gjedde, A., Eiberg, H., Hjerminde, L. E., Hasholt, L., Lundorf, E. & Nielsen, J. E. (2010). Huntington's disease-like and ataxia syndromes: Identification of family with a *de novo* SCA17/TBP mutation. *Parkinsonism and Related Disorders*, 16: 12-15.
  - Benítez-Burraco, A. (2009). Enfermedad de Huntington: fundamentos moleculares e implicaciones para una caracterización de los mecanismos neuronales responsables del procesamiento lingüístico. *Revista de Neurología*, 48 (2): 75-84.
  - Burke, J. R., Enghild, J. J., Martin, M. E., Jou, Y. S., Myers, R. M., Roses, A. D., Vance, J. M. & Strittmatter, W. J. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nature Medicine*, 2: 347-350.
  - Cacciatore, I., Baldassarre, L., Fornasari, E., Mollica, A. & Pinnen, F. (2012). Recent Advances in the Treatment of Neurodegenerative Diseases Based on GSH Delivery Systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012(1): 1-12.
  - Cappai, R. & Collins, S. J. (2004). Structural Biology of Prions. *Medicine and the Public Health System*, 11: 14-32.
  - Castilhos, R. M., Souza, A. D. F., Furtado, G. V., Gheno, T. C., Silva, A. L., Vargas, F. R., Lima, M. A. F. D., Barsottini, O., Pedroso, J. L., Godeiro, C., Salarini, D., Pereira, E. T., Lin, K., Toralles, M. B., Saute, J. A. M., Rieder, C. R., Quintas, M., Sequeiros, J., Alonso, I., Saraiva-Pereira, M. L. & Jardim, L. B. (2013). Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clinical Genetics*, 1: 1-5.
  - Costa, M. C., Teixeira-Castro, A., Constante, M., Magalhaes, M., Magalhaes, P., Cerqueira, J., Vale, J., Barbosa, C., Robalo, C., Coutinho, P., Barros, J., Santos, M. M., Sequeiros, J. & Maciel, P. (2006). Exclusion of mutations in the *PRNP*, *JPH3*, *TBP*, *ATN1*, *CREBBP*, *POU3F2* and *FTL* genes as a cause of disease in Portuguese patients with a Huntington-like phenotype. *Journal of Human Genetics*, 51 (8): 645-651.
  - Curtis, A. R. J., Fey, C., Morris, C. M., Bindoff, L. A., Ince, P. G., Chinnery, P. F., Coulthard, A., Jackson, M. J., Jackson, A. P., McHale, D. P., Hay, D., Barker, W. A., Markham, A. F., Bates, D., Curtis, A. & Burn, J. (2001). Mutation in the gene

encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nature Genetics*, 28: 350-354.

- Duzdevich, D., Li, J., Whang, J., Takahashi, H., Takeyasu, K., Dryden, D. D. F., Morton, A. J. & Edwardson, J. M. (2011). Unusual Structures Are Present in DNA Fragments Containing Super-Long Huntingtin CAG Repeats. *PLOS ONE*, 6 (2): 1-12.
- Ersoy, N. (2007). Molecular genetics of Huntington's Disease: When size does matter. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6 (1): 1-8.
- Gatto, E., Parisi, V., Persi, G., Converso, D. P., Etcheverry, J. L., Varela, V., Alba, L. & Fretchel, G. (2012). Clinical and genetic characteristics in patients with Huntington's Disease from Argentina. *Parkinsonism and Related Disorders*, 18: 166-169.
- Gövert, F. & Schneider, S. A. (2013). Huntington's disease and Huntington's disease-like syndromes: an overview. *Current Opinion in Neurology*, 26: 420-427.
- Greenstein, P. E., Vonsattel, J. P. G., Margolis, R. L. & Joseph, J. T. (2007). Huntington's Disease Like-2 Neuropathology. *Movement Disorders*, 22 (10): 1416-1423.
- Jackson, W. S. (2014). Selective vulnerability to neurodegenerative disease: the curious case of Prion Protein. *Disease Models & Mechanisms*, 7: 21-29.
- Kambouris, M., Bohlega, S., Al-Tahan, A. & Meyer, B. F. (2000). Localization of the gene for a novel autosomal recessive neurodegenerative Huntington-like disorder to 4p15.3. *American Journal of Human Genetics*, 66: 445-452.
- Kasahata, N. & Iwasaki, Y. (2010). Dentatorubropallidolusyan atrophy without involuntary movement or dementia-A case report. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 112: 722-725.
- Keogh, M. J., Morris, C. M. & Chinnery, P. F. (2013). Neuroferritinopathy. *International Review of Neurobiology*, 110: 91-123.
- Margolis, R. L., Holmes, S. E., Rosenblatt, A., Gourley, L., O'Hearn, E., Ross, C. A., Seltzer, W. K., Walker, R. H., Ashizawa, T., Rasmussen, A., Hayden, M., Almqvist, E. W., Harris, J., Fahn, S., MacDonald, M. E., Mysore, J., Shimohata, T., Tsuji, S., Potter, N., Nakaso, K., Adachi, Y., Nakashima, K., Bird, T., Krause, A. & Greenstein, P. (2004). Huntington's Disease-like 2 (HDL2) in North America and Japan. *ANNALS of Neurology*, 56 (5): 670-674.

- Martino, D., Stamelou, M. & Bhatia, K. P. (2013). The differential diagnosis of Huntington's disease-like syndromes: "red flags" for the clinician. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 84: 650-656.
- Martins, S., Matamá, T., Guimaraes, L., Vale, J., Guimaraes, J., Ramos, L., Coutinho, P., Sequeiros, J. & Silveira, I. (2003). Portuguese families with dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) share a common haplotype of Asian origin. *European Journal of Human Genetics*, 11: 808-811.
- Moore, R. C., Xiang, F., Monaghan, J., Han, D., Zhang, Z., Edström, L., Anvret, M. & Prusiner, S. B. (2001). Huntington Disease Phenocopy Is a Familial Prion Disease. *American Journal of Human Genetics*, 69: 1385-1388.
- Muhoberac, B. B. & Vidal, R. (2013). Abnormal iron homeostasis and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5 (32):1-9.
- Nieoullon, A. (2011). Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects. *Journal of Applied Biomedecine*, 9: 173-183.
- Novak, M. J. U. & Tabrizi, S. (2010). Huntington's disease. *Clinical Review*, 341: 34-40.
- Paradisi, I., Ikonomu, V. & Arias, S. (2013). Huntington disease-like 2 (HDL2) in Venezuela: frequency and ethnic origin. *Journal of Human Genetics*, 58: 3-6.
- Reiner, A., Dragatsis, I. & Dietrich, P. (2011). Genetics and neuropathology of Huntington's disease. *International Review of Neurobiology*, 98: 325-372.
- Riccioppo, R. G. G., Walker, R. H., Brice, A., Cazeneuve, C., Russaouen, O., Teive, H. A. G., Munhoz, R. P., Becker, N., Raskin, S., Werneck, L. C., Marques, J. W. & Tumas, V. (2008). Huntington's Disease-Like 2 in Brazil-Report of 4 Patients. *Movement Disorders*, 23 (15): 2244-2255.
- Rodrigues, G. G. R., Teive, H. A. G. & Tumas, V. (2009). Huntington's disease-like 2 and apparent ancestry. *Clinical Genetics*, 25: 207.
- Rodrigues, G. R., Walker, R. H., Bader, B., Danek, A., Brice, A., Cazeneuve, C., Russaouen, O., Lopes-Cendes, I., Marques, W. & Tumas, V. (2011). Clinical and genetic analysis of 29 Brazilian patients with Huntington's disease-like phenotype. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 69 (3): 419-423.
- Roos, C. A. & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurology*, 10: 83-98.
- Roos, R. A. C. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5 (40):1-8.

- Rosales-Reynoso, M. A. & Barros-Núñez, P. (2008). Diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington. *Gaceta Médica de México*, 144 (3): 271-273.
- Santos, C., Wanderley, H., Vedolin, L., Pena, S. D. J., Jardim, L. & Sequeiros, J. (2008). Huntington disease-like 2: the first patient with apparent European ancestry. *Clinical Genetics*, 73: 480-485.
- Schneider, S. A., Walker, R. H. & Bhatia, K. P. (2007). The Huntington's disease-like syndromes: what to consider in patients with a negative Huntington's disease gene test. *Nature Clinical Practice Neurology*, 3 (9): 517-525.
- Segovia, A. J. M. & Mora, T. F. (2002). Enfermedades Neurodegenerativas. *Serie Científica*, 1: 9-13.
- Seixas, A. I., Holmes, S. E., Takeshima, H., Pavlovich, A., Sachs, N., Pruitt, J. L., Silveira, I., Ross, C. A., Margolis, R. L. & Rudnicki, D. D. (2012). Loss of Junctophilin-3 Contributes to Huntington's Disease-Like 2 Pathogenesis. *ANNALS of Neurology*, 71 (2): 245-257.
- Skovronsky, D. M., Lee, V. M. Y. & Trojanowski, J. Q. (2006). Neurodegenerative Diseases: New Concepts of Pathogenesis and Their Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1: 151-170.
- Stevanin, G. & Brice, A. (2008). Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4). *The Cerebellum*, 1 (1): 170-178.
- Stevanin, G., Fujigasaki, H., Lebre, A. S., Camuzat, A., Jeannequin, C., Dodé, C., Takahashi, J., Sâh, C., Bellance, R., Brice, A. & Durr, A. (2003). Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the *TBP* and *JPH3* genes. *Brain*, 126: 1599-1603.
- Sulek-Piatkowska, A., Krysa, W., Zdzienicka, E., Szirkowiec, W., Hoffman-Zacharska, D., Rajkiewicz, M., Fidzianska, E., Kowalska, G. & Zaremba, J. (2008). Searching of mutation in the *JPH3*, *ATN1* and *TBP* genes in Polish patients suspected of Huntington's disease and without mutations in the *IT15* gene. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 42 (3): 203-209.
- Suzuki, Y. & Yazawa, I. (2011). Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubral-pallidolusian atrophy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 4 (4): 378-384.
- Takalo, M., Salminen, A., Soinen, Hilikka., Hiltunen, M. & Haapasalo, A. (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2 (1): 1-14.

- Tomiuk, J., Bachmann, L., Bauer, C., Rolfs, A., Schöls, L., Roos, C., Zischler, H., Schuler, M. M., Bruntner, S., Riess, O. & Bauer, P. (2007). Repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 17 alleles of the TATA-box binding protein gene: an evolutionary approach. *European Journal of Human Genetics*, 15: 81-87.
- Toyoshima, Y., Yamada, M., Onodera, O., Shimohata, M., Inenaga, C., Fujita, N., Morita, M., Tsuji, S. & Takahashi, H. (2004). SCA17 Homozygote Showing Huntington's Disease-like Phenotype. *ANNALS of Neurology*, 55 (2): 281-286.
- Veneziano, L., Mantuano, E., Catalli, C., Gellera, C., Durr, A., Romano, S., Spadaro, M., Frontali, M. & Novelletto, A. (2014). A shared haplotype for dentatorubropallidolusian atrophy (DRPLA) in Italian families testifies of the recent introduction of the mutation. *Journal of Human Genetics*, 59: 153-157.
- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet Reviews*, 369: 218-228.
- Walker, R. H., Jankovic, J., O'Hearn, E. & Margolis, R. L. (2003). Phenotypic Features of Huntington's Disease-Like 2. *Movement Disorders*, 18 (12): 1527-1530.
- Wider, C. & Lüthi-Carter, R. (2006). Huntington's disease: clinical and aetiologic aspects. *Schweiz Archives of Neurology Psychiatry*, 157: 378-383.
- Wild, E. J. & Tabrizi, S. J. (2007). Huntington's disease phenocopy syndromes. *Current Opinion in Neurology*, 20: 681-687.
- Wild, E. J., Mudanohwo, E. E., Sweeney, M. G., Schneider, S. A., Beck, J., Bhatia, K. P., Rossor, M. N., Davis, M. B. & Tabrizi, S. J. (2008). Huntington's Disease Phenocopies are Clinically and Genetically Heterogeneous. *Movement Disorders*, 23 (5): 716-720.
- Wright, S. (2004). Genetic Screening for Huntington's Disease. *Bio Teach Journal*, 2: 40-44.
- Zheng, Z. & Diamond, M. I. (2012). Huntington Disease and the Huntingtin Protein. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 7 (1): 189-214.

# Apéndice 1.

## Carta de consentimiento informado.

	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA "MVS"</b> <b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b> <b>DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE ENFERMEDAD DE HUNTINGTON</b></p>
<p>Fecha: ____/____/____</p>	
<p>He sido informado que es probable que padezca enfermedad de Huntington, esta enfermedad se caracteriza por movimientos involuntarios, alteraciones de conducta y pérdida de memoria. Es un padecimiento hereditario por lo que es frecuente que haya otros miembros de su familia con la misma enfermedad.</p>	
<p><b>PROCEDIMIENTOS A REALIZARSE</b></p>	
<p>Para poder determinar si padezco la enfermedad de Huntington (EH), en primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados así como a las personas que estén en riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro. A continuación se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el DNA y se estudiará el gen responsable de la enfermedad. En una consulta posterior se me informarán los resultados de la prueba, si los resultados obtenidos demuestran que padezco EH se me proporcionará toda la información acerca de la enfermedad.</p>	
<p><b>EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS</b></p>	
<p>Cuando la sangre es obtenida, usted podrá experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.</p>	
<p><b>BENEFICIOS PARA LAS PERSONAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO</b></p>	
<p>La identificación del gen que causa la EH, permitirá establecer el riesgo que otros integrantes de la familia puedan heredar y desarrollar el padecimiento. Es importante mencionar que a pesar de que la enfermedad no tiene tratamiento curativo, el tener un diagnóstico claro permitirá a los médicos tratantes proporcionar mejor atención.</p>	
<p><b>CONSIDERACIONES ECONÓMICAS</b></p>	
<p>Este estudio tiene costo, el cual será cubierto por mí. El costo será de acuerdo al nivel socioeconómico que me ha sido asignado por el departamento de Trabajo Social de este Instituto. Si no soy paciente de este Instituto, pagaré la cantidad de \$1,936.00, al momento de que me sea tomada la muestra.</p>	

Si usted considera que los puntos antes mencionados no están claros, o le surgen nuevas dudas en el tiempo en que le informemos su resultado, puede aclararlas directamente con las responsables de este estudio. Las personas responsables son la Dra. Ma. Elisa Alonso y la M. en C. Adriana Ochoa del departamento de Neurogenética y Biología Molecular y se puede comunicar con cualquiera de ellas al tel. 56 06 38 22 Exts. 2022 y 2018, respectivamente

Estoy de acuerdo en que mi DNA puede ser usado para otras investigaciones que se realizan en este Instituto.

*Estoy de acuerdo*  *No estoy de acuerdo*

**Nombre del paciente:** \_\_\_\_\_ **Registro:** \_\_\_\_\_

**Firma del paciente:** \_\_\_\_\_

**Dirección:** \_\_\_\_\_

**Teléfono:** \_\_\_\_\_

**Nombre y firma del Responsable legal:** \_\_\_\_\_

**Teléfono:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Testigo (parentesco)**

\_\_\_\_\_  
**Testigo (parentesco)**

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma de quien obtuvo el consentimiento**

## Apéndice 2.

### A) Reactivos

- Agarosa ultrapura (*Promega*).
- Agua libre de nucleasas (*QIAGEN*).
- Bromuro de etidio (*AMRESCO*).
- Amortiguador de carga (*Fermentas*).
- Cloroformo-Alcohol isoamílico (proporción 29:1).
- Estuche comercial de purificación de productos de PCR QIAquick (*QIAGEN*).
- Estuche comercial de secuenciación: Big-Dye Terminator V3.1 CycleSequencing (*Applied Biosystems*).
- Marcador de peso molecular 100pb ladder (*Invitrogen*).
- Amortiguador SB 20X [200 mM NaOH, 760 mM ácido bórico]: Hidróxido de sodio (8g), ácido bórico (47g), agua (c.b.p. 1L).
- BLGR: Cloruro de amonio (8.28g), bicarbonato de potasio (1g), EDTA (200mL), agua (c.b.p 1L).
- Poliacrilamida con urea al 6%: acrilamida 40% (150mL) (*BIO RAD*), amortiguador SB 10X (100mL), urea (420g) (*SIGMA*).
- Secuencias de oligonucleótidos para los genes analizados:

Gen	Oligo Forward (5'>3')	Oligo Reverse (5'>3')	Tm
<i>TBP</i>	GCTCCGAAGCTTCCTTATGGCACT GGACTGAC	GATGCGTCTAGAGTTCCTGTGTTG CCTGCTG	55°C
<i>TBP</i> (análisis de fragmentos)	GACCCACAGCCTATTCAGA	GGGACGTTGACTGCTGAAC	58°C
<i>JPH3</i>	GGTTCCCTGCACAGAAACCATC	AGATGCCACCGCATTCCGG	60°C
<i>PRNP</i>	GATGCTGGTTCTCTTTGTGG	CCCCTATCAGGAAGATGAG	56°C
<i>ATN1</i>	CCCAGTCCACCGCCACCCACCA	TGCTCCAGGAGGAGGGGGCCAGA	69°C
<i>FTL</i>	TCAAGCCTCTGCTCCCTTTG	CCCACCTCATCTCCACACC	62°C

## **B) Equipos y materiales.**

- Agitador: DaiggerVortex Gene 2.
- Balanza: Denver Instrument Company AA-200.
- Cámaras de electrophoresis: Life Technologies.
- Centrífuga: Eppendorf 5415D, Eppendorf 5810R.
- Concentrador al vacío: Eppendorf 5301.
- Cuantificador de DNA: Thermo Scientific Nano Drop 2000.
- Fotodocumentador Bio Rad Gel Doc XR+.
- Fuente de poder: Bio Rad Power Pac 3000.
- Secuenciador ABI PRISM 3130.
- Termocicladores: Applied Biosystems 2720, Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700, Axygen Maxygene II.
- Termomezclador: Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf Thermomixer Compact.
- Transiluminador: Labnet DyNA Light.
- Tubos *Vacutainer* con citrato de sodio aditivo anticoagulante.