



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO MOLECULAR DE PACIENTES MESTIZO-MEXICANOS CON
VASCULOPATÍAS RETINIANAS Y LEUCODISTROFÍA CEREBRAL**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Oswaldo Hinojosa Ortiz

MÉXICO, D.F.

AÑO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Marisol López López

VOCAL: Samuel Canizales Quinteros

SECRETARIO: Nancy Monroy Jaramillo

1er. SUPLENTE: Martha Patricia Coello Coutiño

2° SUPLENTE: Aurora Lara Núñez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. en C. Nancy Monroy Jaramillo

SUSTENTANTE (S):

Osvaldo Hinojosa Ortiz

Abreviaturas

aa: Aminoácido

AB: Applied Biosystems

AGS: Síndrome de Aicardi-Goutières

BLGR: Solución amortiguadora de glóbulos rojos

CADASIL: Arteriopatía cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía con patrón de herencia autosómico dominante

CARASIL: Arteriopatía cerebrales con infartos subcorticales y leucoencefalopatía con patrón de herencia autosómico recesivo.

ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato

del: Delección

DNA: Acido desoxirribonucleico

dup: Duplicación

HERNS: Endoteliopatía hereditaria con retinopatía, nefropatía e infartos cerebrales, por sus siglas en inglés "*Hereditary endotelipathy with retinopathy, nephropathy and stroke*"

HVR: Retinopatía vascular hereditaria, por sus siglas en inglés "*Hereditary vascular retinopathy*"

INNMVS: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velazco Suarez

LES: Lupus eritematoso sistémico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RCV: Vasculopatías retiniano-cerebrales

RVCL: Por sus siglas en inglés “*retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophia*”

TREX1: Por sus siglas en inglés “*Three prime repair exonuclease 1*”

SB: Solución de boratos

Índice	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	3
Antecedentes.....	3
Cuadro clínico.....	4
Genética de <i>TREX1</i>	6
Funciones de TREX1.....	11
Diagnóstico de RVCL.....	15
Reacción de PCR.....	15
Secuenciación de Sanger.....	18
Planteamiento del problema.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivo.....	21
Sujetos y Métodos.....	22
Resultados.....	38
Discusión.....	44
Conclusiones.....	51
Referencias.....	52
Anexos.....	55

Resumen

La vasculopatía retiniana con leucodistrofia cerebral (RVCL) es una enfermedad vascular en la cual hay una degeneración de los pequeños vasos sanguíneos, especialmente en ojos y cerebro, permitiendo el paso de leucocitos a zonas inmunoprivilegiadas del organismo.

Esta enfermedad aparece en la cuarta década de la vida provocando la muerte de los pacientes a los 5-10 años de la aparición de los síntomas. Entre las características clínicas de esta enfermedad se encuentran signos y síntomas como migrañas, pérdida gradual de la vista, nefropatías, disminución en las actividades motoras y sensoriales, entre otras.

RVCL es una enfermedad hereditaria con un patrón autosómico dominante que es causada por mutaciones en el gen *TREX1* (“*three prime exonuclease 1*”). Este gen codifica para la proteína TREX1 que está encargada de la eliminación de DNA de cadena sencilla, producto de infecciones virales o errores en la transcripción del DNA en el núcleo celular.

Gran parte de las mutaciones en *TREX1* causantes de RVCL se encuentran cerca de la región carboxilo terminal de la proteína resultante. Estas mutaciones provocan la formación de señales de paro prematuro generando proteínas truncas.

El diagnóstico clínico de la enfermedad es difícil por la variabilidad en los síntomas de la enfermedad, es necesario el uso de técnicas moleculares que nos permitan determinar de manera precisa la presencia de esta enfermedad. Así mismo, el diagnóstico confirmatorio de RVCL permitirá dar el tratamiento oportuno a los pacientes, ofrecer diagnóstico predictivo, seguimiento y cambios de hábitos en portadores aún sin manifestaciones clínicas de RVCL, para retrasar la aparición de

los síntomas, y ofrecer asesoramiento genético adecuado para los pacientes y sus familiares.

En este trabajo se demostró que las técnicas de biología molecular son una excelente herramienta para el diagnóstico clínico de la enfermedad hereditaria RVCL que se presenta con un cuadro complejo de signos y síntomas. Se realizó un análisis de la secuenciación de DNA en 3 pacientes con diagnóstico clínico de RVCL. Estos pacientes se encontraban relacionados y procedían de una comunidad pequeña donde referían más afectados, por lo que se hizo el análisis de muestras de familiares de estos, algunos de los cuales comenzaban a presentar síntomas de RVCL.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Las microangiopatías cerebrales son responsables de un gran número de accidentes cerebro-vasculares. Estas condiciones incluyen: arteriopatías cerebrales con infartos subcorticales y leucoencefalopatía con patrón de herencia autosómico dominante (CADASIL), y autosómico recesiva (CARASIL); enfermedades de los pequeños vasos cerebrales relacionadas con COL4A1; y la vasculopatía retiniana con leucodistrofia cerebral (RVCL) heredada de forma autosómica dominante. Aunque los fenotipos varían y los genes involucrados son diferentes, todas estas enfermedades producen arteriopatía y desintegración microvascular con cambios en las funciones cerebrales. En estas enfermedades son imperativas las pruebas moleculares para un diagnóstico confirmatorio y concluyente (Yamamoto Y. y otros 2012; Federico A. y otros 2012).

Descrita por primera vez por Mark Gilbert Grand (Grand MG y otros, 1988), la RVCL fue definida como una enfermedad hereditaria caracterizada por pseudotumores en el lóbulo frontal del cerebro y anomalías en los vasos capilares de la retina. En aquellos tiempos, se le denominó enfermedad vascular retiniana (HVR).

En el 2001 Roel A. Ophoff y colaboradores hicieron un análisis de asociación de varias familias danesas que presentaban vasculopatías retiniano-cerebrales (RCV); endotelopatía hereditaria con retinopatía, nefropatía e infartos cerebrales (HERNS) y una familia con HVR. Estos investigadores identificaron que la región cromosómica 3p21.3-p21.1 está ligada a las tres condiciones de estas familias (Ophoff RA y otros, 2001).

Esta investigación demostró que las tres entidades clínicas: HVR, HERNS y RVC se trataban de una misma enfermedad por lo que se cambió el nombre a vasculopatía retiniana con leucodistrofia cerebral (RVCL) [OMIM#192315].

Cuadro clínico de la RVCL

La RVCL es una enfermedad de características clínicas variables (heterogeneidad clínica). Entre los síntomas más comunes se encuentran las migrañas, la pérdida progresiva en la agudeza visual y alteraciones en las funciones motoras y sensoriales (Figura 1). Alrededor del 33% de los pacientes tienen alteraciones hepáticas y renales (Kavanagh, y otros, 2008).

Esta enfermedad suele manifestarse en la cuarta década de la vida, con una esperanza de vida de 5 a 10 años después de la primera aparición de los síntomas. Cabe mencionar que la enfermedad tiene una penetrancia del 100%, por lo que, al heredarse de manera autosómico dominante existe un 50% de probabilidad de que la descendencia adquiera la enfermedad si uno de los padres está afectado y del 75% si ambos progenitores son portadores. Hasta el momento no se han descrito casos donde las mutaciones causantes se encuentren en estado homocigoto (OMIM, 2014).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de RVCL (Kavanagh, y otros, 2008).

RVCL	Neurológicas	Oftalmológicas	Afecciones en otros órganos	Resultados de laboratorio en pacientes con RVCL
Signos y síntomas	Infartos, pseudotumores, convulsiones, déficit motor y sensorial, migrañas, cambios de personalidad y déficit en la agudeza mental.	Degeneración de la mácula, microaneurismas, telangiectasia, disminución del calibre de los vasos capilares y pérdida progresiva de la agudeza visual.	Cirrosis hepática, sangrado del tracto digestivo, disfunción renal, fenómeno de Raynaud.	Proteinuria, hematuria, proteínas elevadas en líquido cefalorraquídeo.



Figura 1. Fenómeno de Raynaud. Alteración vascular en la cual una temperatura ambiental baja o emociones fuertes provocan el bloqueo del flujo sanguíneo en dedos de manos, pies, orejas y nariz. Esta afección comienza con una coloración pálida debida a una disminución en el flujo sanguíneo, seguida de una cianosis consecuencia de la dilatación de capilares sanguíneos manteniendo sangre en los tejidos. Finalmente el área afectada se torna de color rojo cuando el capilar recupera su flujo normal de sangre. (Imagen tomada y modificada de: Medlineplus, 2014)

Genética de *TREX1*

El gen *TREX1* [*606609] se localiza en 3p, en la posición 3:48,506,918 - 48,509,043. Citogenéticamente el gen se encuentra en la banda G 21.31 (Figura 2). Este gen codifica para una proteína de 314 aminoácidos (aa) del mismo nombre, cuya principal función es la degradación de DNA de cadena sencilla, producto de errores en la replicación o de procesos infecciosos virales (Lindahl T y otros, 2009).

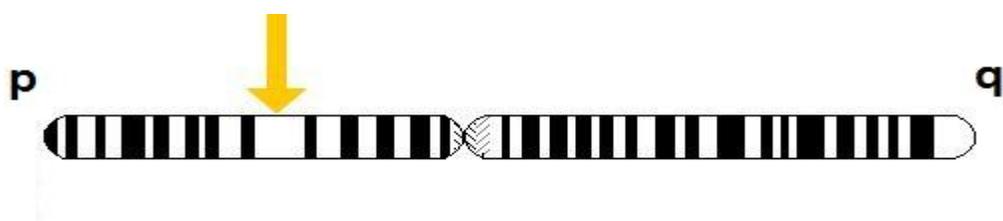


Figura 2: Ubicación citogenética del gen *TREX1*. La flecha indica la posición del gen en el brazo corto del cromosoma 3 en la posición 3p21.31. (Tomado de *Genetics Home Reference*, 2014)

Las mutaciones a lo largo de este gen dan como resultado enfermedades de sintomatología variable. Como se puede observar en la figura 3, la mayoría de las mutaciones que resultan en RVCL corresponden a deleciones o inserciones que provocan un corrimiento en el marco de lectura que, en consecuencia, provocan un codón de paro prematuro y generan proteínas truncadas. Las proteínas anormales carecen del dominio transmembranal, el cual permite la localización de la proteína en la región perinuclear de la célula (Richards A y otros, 2007).

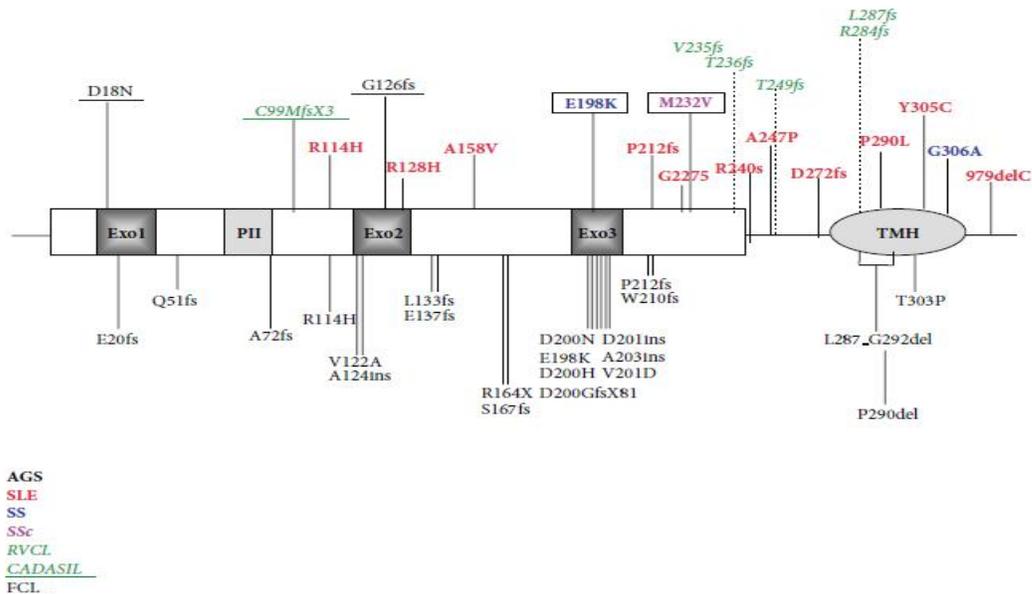


Figura 3: Mutaciones a lo largo del gen *TREX1* y dominios proteicos a los cuales afectan. Las regiones Exo1, Exo2 y Exo3 se refieren a los dominios con función de exonucleasa de la proteína. La región TMH se refiere a la región transmembranal que localiza a la proteína en el espacio perinuclear de la célula. La región PH se refiere al dominio de poliprolinas tipo II. El color y tipo de letra en la parte inferior de la figura indican a que cuadro clínico se asocian las mutaciones (Modificada de Barizzone N. y otros, 2013).

Además de las mutaciones localizadas en la región 3' terminal del gen, existen muchas otras a lo largo de *TREX1*. Estos errores en la secuencia silvestre, llevan a cuadros clínicos diferentes. En la tabla 2 se puede observar un resumen de las mutaciones que han sido reportadas en *TREX1*.

Como ya ha sido mencionado, el gen *TREX1* presenta un fenómeno de heterogeneidad alélica. Se han reportado varias mutaciones (Figura 3, Tabla 2) las cuales tienen como consecuencia enfermedades con diferentes cuadros clínicos que se presentan a diferentes etapas de la vida. Los cuadros clínicos que se

presentan con más frecuencia por mutaciones a lo largo del gen son: lupus sistémico eritematoso (OMIM #152700), el subtipo de lupus pernio (OMIM #610448) y el síndrome de Aucardi-Goutières (OMIM #225750), además de RVCL.

SLE es una enfermedad autoinmune caracterizada por una condición de inflamación crónica. Algunos síntomas de SLE son dolor articular, fiebre y erupciones cutáneas. Los pacientes que presentan mutaciones en *TREX1* asociadas a SLE esporádico inician entre los 10 y 40 años de edad. Las mutaciones asociadas a SLE en *TREX1* son raras, altamente penetrantes y se encuentran a lo largo del gen (Figura 3) (Barizzzone N. y otros, et al, 2013).

La enfermedad autoinmune de lupus pernio (*familial chilblain lupus*) o sarcoidosis cutánea familiar se caracteriza por la aparición de hematomas en los dedos de manos y pies, así como nariz y orejas muy parecidos a aquellos provocados por temperaturas muy bajas. Todas las mutaciones en *TREX1* asociadas a esta enfermedad están en los dominios catalíticos de la proteína y se heredan con un patrón de herencia autosómico recesivo.

El síndrome Aucardi-Goutières se caracteriza por una disfunción cerebral severa en los primeros años de vida. Los pacientes con este padecimiento presentan encefalopatía y un profundo retraso de habilidades (regresión o retraso psicomotor). Hay un traslape entre los síntomas inflamatorios de esta enfermedad y la enfermedad autoinmune de lupus pernio. La causa genética de esta enfermedad es la mutación homocigota en la región catalítica de la proteína *TREX1* con la consecuente pérdida de función (Kavanagh, y otros, 2008). A continuación se detalla este tipo de mutaciones.

Mutaciones con corrimiento en el marco de lectura

La cadena de DNA es un polímero compuesto por 4 nucleótidos diferentes en una secuencia. En este sentido, las mutaciones son cambios heredables en la

secuencia de DNA. Estos procesos de mutación ocurren de manera natural y, en general, son reparados por mecanismos celulares.

Entre las consecuencias más importantes de una mutación se encuentra el corrimiento del marco de lectura. Cuando se da este fenómeno hay un error en la secuencia de codones que lleva a la traducción de una proteína con una secuencia diferente de aminoácidos a partir del sitio donde ocurrió el corrimiento del marco de lectura. Entre las mutaciones que tienen como consecuencia el corrimiento del marco de lectura se encuentran las inserciones, deleciones y translocaciones.

Las inserciones se dan cuando uno o varios nucleótidos se agrega a la cadena de DNA. Las deleciones son la pérdida de uno o varios nucleótidos en la secuencia de DNA.

Inserción: TAAGTCG→TAAGTTTCG

Delección: TAAGTCG→TAACG (-GT)

Finalmente existen las translocaciones. De manera similar a la inversión, en la translocación un fragmento de DNA se escinde, sin embargo, este fragmento se une a una cadena diferente de DNA (Strachan T & Read AP, 2011).

Translocación: TAA**GTCG** → ACC**GTCG**GGA

Tabla 2: Mutaciones reportadas en la literatura para el gen *TREX1*. (Fuente: *The Human Mutation Database* en www.hgmd.org)

Cuadro clínico	# MUTACIONES	TIPO DE MUTACIÓN
Síndrome Aucardi-Goutières (AGS) [OMIM#225750]	19	<ul style="list-style-type: none"> •7 de sentido erróneo •7 inserciones •4 deleciones •1 sin sentido
Lupus eritematoso sistémico (LES) [OMIM#152700]	8	<ul style="list-style-type: none"> •6 de sentido erróneo •1 inserción •1 deleción
RVCL [OMIM#192315]	5	<ul style="list-style-type: none"> •5 inserciones
Lupus familiar “<i>chillblain</i>” (FCL)” [OMIM#610448]	3	<ul style="list-style-type: none"> •2 de sentido erróneo •1 inserción.

La proteína TREX1 pertenece a la súper familia de exonucleasas 3' a 5' DEDD (del inglés DNAQ-like). *TREX1* se encuentra altamente conservado entre diferentes especies de mamíferos (Figura 4).

Humano	CCCATG	FATGGGGTCACA	SCCTCTGCTAGGACCAAGCCAAGACCATCTGCTGTGCACAACCACTGCACACCTGGCCACAACCAGGAACACTAGTCCCAGC
Chimpancé	CCCATG	FATGGGGTCACA	SCCTCTGCTAGGACCAAGCCAAGACCATCTGCTGTGCACAACCACTGCACACCTGGCCACAACCAGGAACACTAGTCCCAGC
Orangután	CCCATG	FATGGGGTCACA	SCCTCTGCTAGGACCAAGCCAAGACCATCTGCTGTGCACAACCACTGCACACCTGGCCACAACCAGGAACACTAGTCCCAGC
Babuino	CCCATG	FATGGGGTCACA	SCCTCTGCTGGGACCAAGCCAAGACCATCTGCTGTGCACAGCCCCTGCACACCTGGCCACAACCAGGAACACTAGTCCCAGC
Tamarino	CCCATG	FATGGGGTCACA	SCCTCTGCTAGTACCAAGCCAAGACCATCTGCTGTGCACAGCCACTCTACACCTGGCCACAACCAGCAATGCTAGTCCCAAGC
Caballo	CCGATG	FATGGGGTCACA	SCCTCTACTGGAACCAACCTAAGGCCATCTGCTGCCACAGCCACTGTACCCCTGGCCAGAGCCAGGGACACCAGTCCC AAC
Gato	CCCATG	FATGGGGTCGTA	SCCTCTGCTGGAACCAACCAGGACCATCTGCCACCGCAGCCACTGTATCCCTGACTAGAGCCAGGGACACTAGTCTCTAAG

Figura 4: Alineamiento múltiple de la secuencia parcial del exón codificante de *TREX1* en siete especies. Encerrado en un recuadro rojo se encuentra el sitio donde ocurre la mutación g.3688_3689insG que provoca un corrimiento en el marco de lectura al momento de la traducción. (Ensembl, 2014)

Funciones de la proteína TREX1

La proteína resultante de la traducción del gen *TREX1* (Figura 5) es una exonucleasa dimérica que actúa en dirección 3' a 5' y es la que se encuentra en mayor proporción en la célula. Los primeros 242 aa conforman el sitio catalítico de la proteína que se encarga de la degradación de DNA de cadena sencilla. Los aa restantes (243-314) conforman el domino transmembranal que localiza a la proteína en la región perinuclear, más específicamente sobre el retículo endoplásmico de la célula (Yamamoto Y, y otros, 2011; uniprot, 2014 ID: Q9NSU2).

La exonucleasa se expresa en todas las células de mamíferos, y en gran concentración en células del sistema inmune (Perrino, 2001). En linfocitos B tiene una concentración de $1.1 \cdot 10^3$ ng/ml (Kolker E, 2012), lo que nos permite inferir su gran importancia en procesos de degradación de DNA propio pues este actúa como un patrón molecular asociado a daño (DAMP) y en procesos infectivos como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP).

Se han realizado estudios de actividad de la molécula y está requiere de la unión de iones metálicos divalentes. Siendo que la actividad de exonucleasa 3'-5' es similar a la de varias polimerasas, se han realizado estudios de alineamiento de secuencias proteicas. Se observó que la proteína tiene similitud en sus dominios de exonucleasa (exo1, exo2 y exo3) con varias polimerasas con actividad 3'→5', además de que contiene aminoácidos en su secuencia que son cruciales para la unión de metales (Mazur D J & Perrino F W, 1999).

La proteína cuenta con un dominio de poliprolina tipo II, el cual es crucial para la interacción proteína-proteína. TREX1 participa en la apoptosis celular vía granzima A al unirse al complejo SET y translocarse de la región perinuclear al núcleo degradando DNA nuclear (Kavanagh, y otros, 2008).

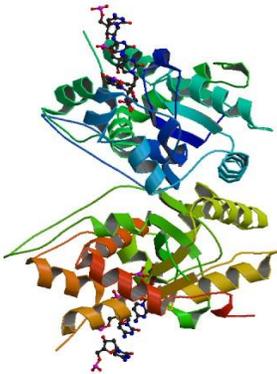


Figura 5. Homodímero de *Trex1* en ratón. Se observa la estructura de la proteína cuanto esta interactuando con DNA de cadena sencilla. Fuente: *PROTEIN DATABANK*, 2014

El complejo SET es un conjunto de proteínas que se encuentran en el citoplasma. Las proteínas que conforman al complejo SET son:

- SET: Proteína con actividad de rearreglo del nucleosoma. Además interactúa con CBP (*CREEB-Binding protein*) siendo los reguladores de la transcripción.

- NME1: Proteína encargada de la formación de nucleótidos trifosfatados con excepción del trifosfato de adenosina (ATP).
- Ape1: Del inglés *apurinic/aprimidinic endonuclease 1*. Es una endonucleasa que es activada por daño oxidativo al DNA. Al ser escindida por la granzima corta DNA provocando la apoptosis de la célula.
- HMG2: *Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase*. Altera la estructura de la cromatina, tiene función de helicasa y regula la transcripción al exponer el DNA a las proteínas encargadas.
- pp32: Fosfoproteína nuclear 32. Funciona como proteína supresora de tumores.

Además de esta interacción, TREX1 interactúa de manera muy cercana con proteínas encargadas de la replicación y reparación de DNA celular (Figura 6). Algunas de las proteínas con las que trabaja de manera muy estrecha son:

- ATR: Proteína cinasa de treonina/serina relacionada a ataxia y telangiectasia. Forma complejos con MSH2 para reparar errores en la replicación del DNA. Junto con ATRIP pueden sensor el daño genómico en la célula y detener la replicación celular para dar inicio a la reparación (Cortez D, Guntuku S, & Elledge S, 2001).
- MSH2: Homólogo de la proteína mutS2. Forma un complejo con ATR para reparar errores de alineación de la DNA polimerasa.

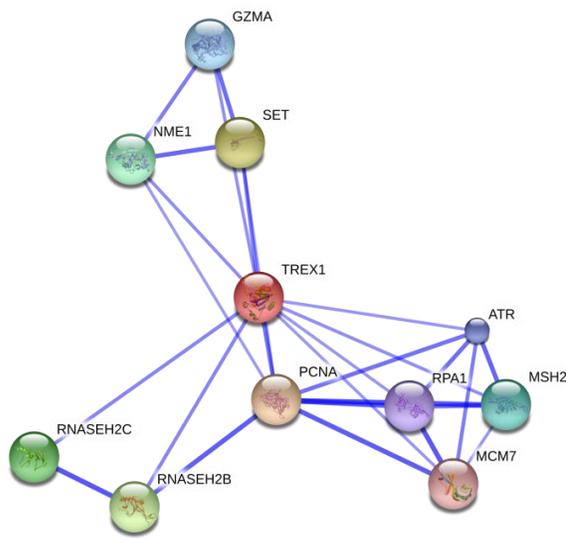


Figura 6: Mapa de interacciones de la proteína TREX1. Se pueden observar varias proteínas cuya función es requerida en la reparación y replicación del DNA (STRING - Known and Predicted Protein-Protein Interactions, 2014).

TREX1 pertenece a la súper familia de las exonucleasas *DNAQ-like* o DNAsa III. Esta es una familia de proteínas altamente conservadas evolutivamente. Esta familia de proteínas cataliza la escisión de nucleótidos monofosforilados en DNA o RNA en la dirección 3' a 5' (Conserved Domains, 2014).

Como ha sido mencionado antes, los 242 aa de la región amino-terminal contienen el dominio catalítico de la enzima, mientras que, los restantes 76 aa contienen una región rica en leucina necesaria para la asociación de la proteína al retículo endoplásmico (Lindahl y otros, 2009; Orebaugh y otros, 2013). Sin embargo, durante la fase S del ciclo celular y en respuesta a estrés genotóxico, TREX1 se difunde al núcleo (Lindahl y otros, 2009).

Una consecuencia de la ausencia de TREX1 en la célula, es la acumulación de ácidos nucleicos que activan mecanismos del sistema inmune innato. Esto último provocando defectos en el proceso de mielinización y promoviendo la calcificación del tejido nervioso (Brooks P J, Cheng T & Cooper L, 2008).

Diagnóstico de RVCL

Este padecimiento tiene un cuadro clínico muy difícil de diferenciar de otras enfermedades vasculares (Tabla 1). Los síntomas característicos aparecen alrededor de la 4ª década de la vida. Estudios de imagen permiten al médico saber si existen micro-infartos cerebrales, mientras que estudios de histopatología revelan si hay necrosis isquémica en tejido nervioso. Sin embargo, ninguno de estos estudios (algunos de estos muy invasivos) permite dar un diagnóstico claro de la enfermedad.

Siendo que RVCL es una enfermedad autosómica dominante de la cual se conoce el gen involucrado, las técnicas de biología molecular son las más adecuadas para poder hacer un diagnóstico certero. A continuación se explican las técnicas empleadas en el diagnóstico molecular de la enfermedad RVCL.

Reacción de PCR

La reacción de PCR se refiere una reacción en cadena de la polimerasa. Desarrollada por primera vez por Kary Mullis. Esta es una reacción *in vitro* simulando las condiciones necesarias para que inicie la replicación del DNA. Entre los reactivos necesarios para la PCR se encuentran:

- DNA: muestra de DNA que se pretende analizar.
- DNA polimerasa: La enzima utilizada tiene como característica especial su resistencia a altas temperaturas. Tradicionalmente se ha utilizado la polimerasa del organismo *Thermophilus aquaticus*.
- Oligonucleótidos: pequeños fragmentos de ácidos nucleicos (DNA o RNA) complementarios a la cadena de DNA y que flanquean la secuencia que se pretende analizar. Se necesita un fragmento que se una a la cadena sentido y uno a la cadena anti-sentido.

- dNTPs: Desoxinucleósidos trifosfato. Son los monómeros necesarios para la replicación del DNA.
- Cationes divalentes como magnesio II (Mg^{2+}) o manganeso (Mn^{2+}) como cofactor de la enzima DNA polimerasa.

La PCR es una técnica que consta de varias etapas (Figura 7). Estas etapas se repiten de manera cíclica, por lo que se tiene un crecimiento exponencial de los fragmentos de DNA que se pretenden analizar (Strachan T & Read AP, 2011).

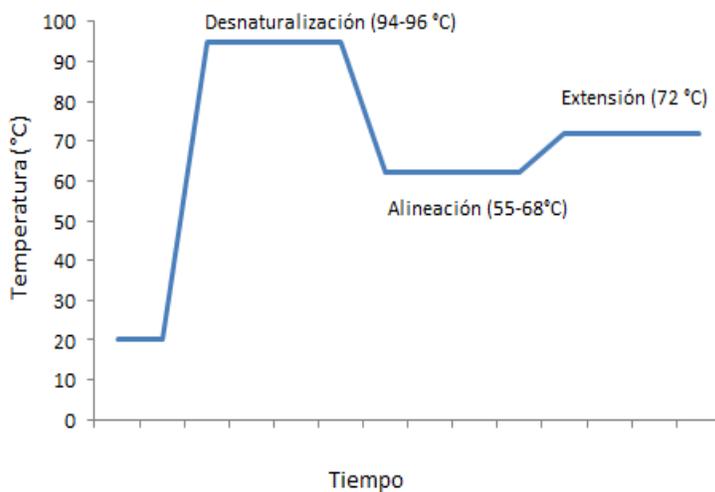


Figura 7. Etapas de la reacción de PCR. En la etapa de desnaturalización se rompen los puentes de hidrógeno del DNA formando cadenas sencillas. En la alineación se unen los oligonucleótidos complementarios a la secuencia y finalmente en la extensión la polimerasa sintetiza la nueva cadena de DNA.

La DNA polimerasa es una enzima que cataliza la síntesis de cadenas de DNA en la replicación (Figura 8). Esta posee características las cuales son aprovechadas tanto en la reacción de PCR como en la reacción de secuenciación. Entre estas características se encuentran:

- Uso del grupo funcional $-OH$ 3' del nucleótido como sustrato para la elongación de la cadena nueva. De esta manera, la elongación de la cadena siempre se da del extremo 5' al extremo 3'.

- Algunas de las polimerasas tienen una función de lectura y corrección del DNA (*proofreading*). Así, la replicación de DNA tiene la menor cantidad de errores posibles (Strachan T & Read AP, 2011).
- Las DNA polimerasas que son utilizadas en biología molecular tienen una actividad que incorpora alrededor de 60 nucleótidos por segundo a temperatura óptima (Biorad, 2014).

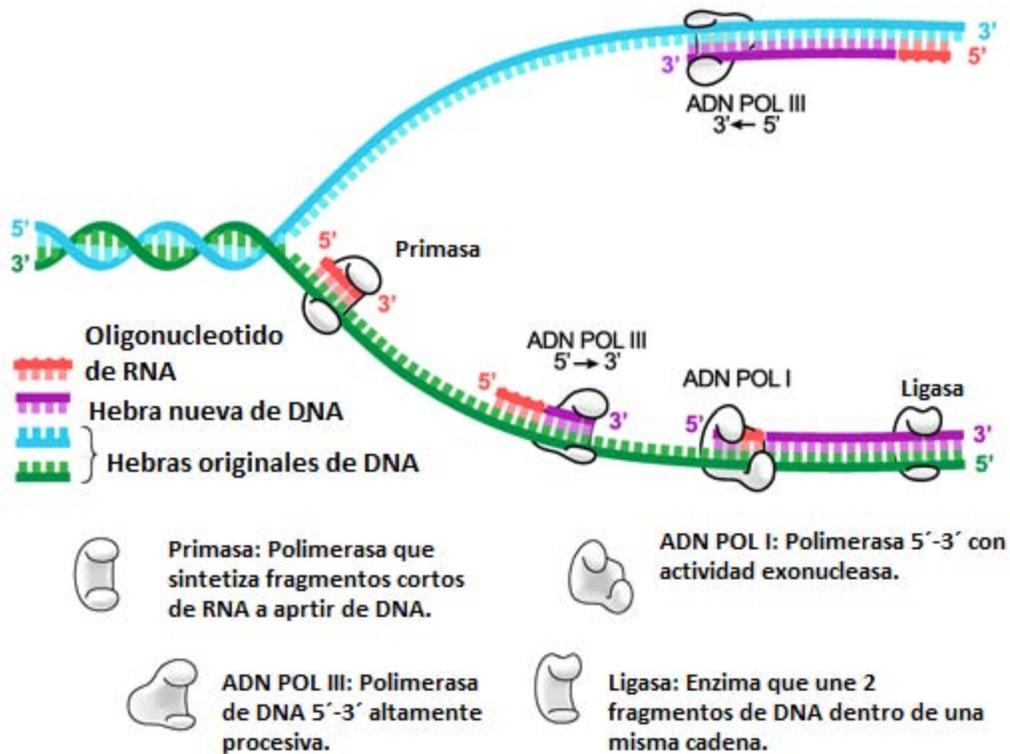


Figura 8: Proceso de replicación de DNA *in vivo*. Dentro de una célula, el proceso por el cual el DNA es replicado requiere de un sistema de proteínas y ácidos nucleicos para poder clonar la cadena de DNA. (Imagen tomada y modificada de: <http://www.shmoop.com/dna/dna-replication.html>)

Secuenciación de Sanger

La reacción de secuenciación de Sanger es un método de síntesis enzimática. Esta reacción aprovecha muchas de las propiedades que tiene la DNA polimerasa para la síntesis de DNA. En particular, el hecho de que la elongación de la cadena requiere que exista un grupo hidroxilo libre 3' en el nucleótido perteneciente a la cadena de DNA para la reacción de sustitución nucleofílica (Hardin, 2001). Es así que, al agregar dideoxynucleótidos (moléculas similares a los nucleótidos que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3'), la reacción de polimerización de DNA se detiene dejando fragmentos de diferentes tamaños que pueden ser separados por métodos físicos como la electroforesis y la cromatografía.

En el INNNMVS se cuenta con un equipo de secuenciación automatizado, modelo AB3130. La reacción de secuenciación de Sanger para estos equipos utiliza ddNTPs que están marcados con moléculas fluorescentes que emiten luz a una longitud de onda diferente para cada uno de los nucleótidos que conforman la cadena de DNA. Una vez que ha terminado la reacción esta se purifica eliminando del medio de reacción a los ddNTPs que no forman parte de los fragmentos de DNA que van a ser leídos por el equipo. Una vez dentro del equipo de secuenciación automatizada, los fragmentos de DNA son separados por medio de una electroforesis capilar y cada fragmento se lee aprovechando la marca fluorescente y el sistema de detección de luz del equipo (Figura 9).

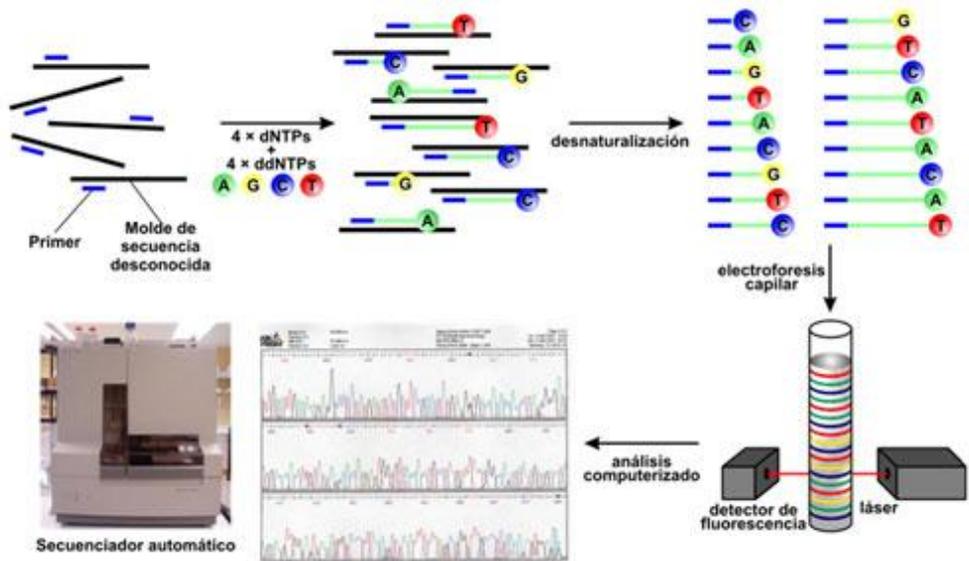


Figura 9: Diagrama de flujo del proceso de secuenciación automatizado. Tomado de http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Secuenciacion_Masiva&opc=introduccion

Planteamiento del problema

En el INNNMVS se presentó un caso diagnosticado como glioma de alto grado que murió al año del diagnóstico. Se realizó una biopsia de cerebro confirmando que el paciente tenía un pseudotumor cerebral. En los años siguientes, se presentaron 2 hermanos los cuales mostraban cuadros clínicos oftalmológicos y neuronales variables. Uno de estos hermanos fue diagnosticado con esclerosis múltiple y es puesto en tratamiento para esta enfermedad. Sin embargo, solo respondió a interferón β . Con sospecha de RVCL, se decidió hacer una prueba de biología molecular en los hermanos resultando positivos para el padecimiento. Haciendo búsqueda en sus antecedentes familiares y en su genealogía, se descubre que tienen relación familiar con el individuo diagnosticado con glioma de alto grado.

Además, estos pacientes refirieron que otros miembros de su familia padecían de síntomas similares, en las menos cuatro líneas generacionales. Debido a esto, se acudió a la comunidad de donde son originarios (Ixtapan de la Sal, Estado de México), se tomaron muestras de sangre periférica, extrayendo el DNA y se analizaron las muestras de miembros de la familia que aceptaron participar voluntariamente en el protocolo y que además fueran mayores de edad.

Debido a la gran variabilidad fenotípica, las pruebas convencionales de laboratorio e imagen utilizadas para el diagnóstico de vasculopatías no son suficientes. Por ello, es necesario el uso de técnicas de biología molecular que nos permitan asegurar que se dio el diagnóstico clínico correcto para encaminar al paciente a un tratamiento eficiente o, en caso de no existir tal, el cambio de hábitos en su estilo de vida que permitan retrasar la aparición de síntomas en el paciente.

Existen alrededor de diez familias con RVCL que han sido analizadas en el mundo (OMIM #192315, 2014). En México, estos son los primeros casos reportados de

RVLC, los cuales comparten una mutación que ha sido descrita en una familia holandesa y dos familias estadounidenses (Storimans CW, y otros, 1991; Richards A y otros, 2007).

Hipótesis

Las herramientas de biología molecular permitirán un diagnóstico certero en casos sintomáticos y asintomáticos de RVCL.

Objetivo

Determinar la frecuencia de las mutaciones correspondientes a RVCL en el gen *TREX1* en una comunidad mestizo-mexicana del Estado de México.

- Secuenciar el exón codificante de *TREX1* en pacientes con RVCL y voluntarios pertenecientes a la misma familia mediante una técnica de secuenciación modificada de Sanger.
- Identificar las mutaciones presentes en la secuencia y analizarlas con herramientas bioinformáticas.

Sujetos y métodos

Muestra

Los tres pacientes incluidos en este trabajo fueron diagnosticados con RVCL por al menos dos neurólogos expertos en enfermedades vasculares del INNNMVS. Todos los pacientes aceptaron participar en el estudio firmando una carta de consentimiento informado.

Los 36 voluntarios, originarios del Estado de México (Figura 10) fueron previamente informados de los objetivos del trabajo y firmaron también un consentimiento informado (Anexo 3).

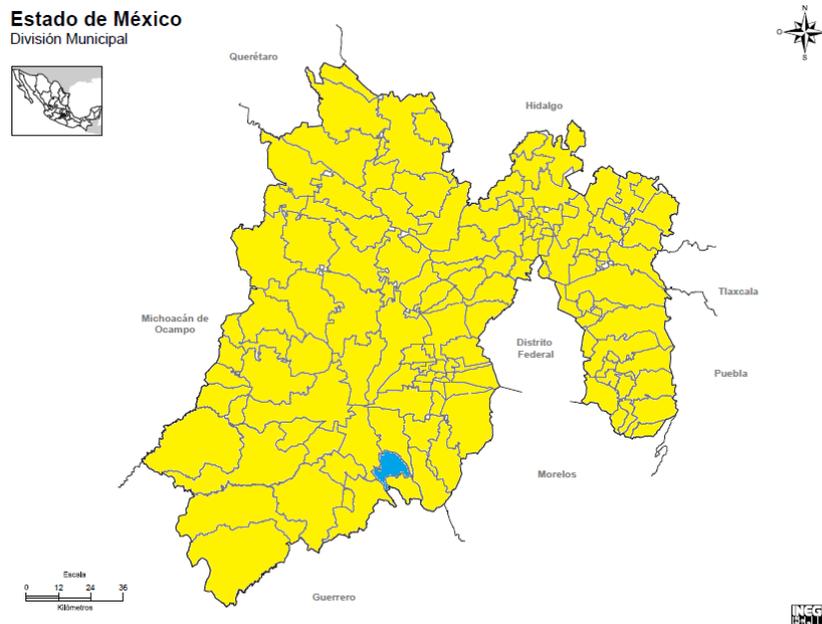


Figura 10: Mapa del Estado de México. En azul se encuentra el municipio de Ixtapan de la Sal, región de donde es originaria la familia. El municipio cuenta con 33 541 habitantes hasta el 2010 según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Imagen tomada y modificada de <http://www.cuentame.inegi.org.mx>.

Tabla 3: Características generales de los pacientes con RVCL.

# Paciente	Género	Edad	Antecedentes familiares
1	Masculino	51	Si
2	Femenino	45	Si
3	Masculino	50	Si

Tabla 4: Características generales de los voluntarios.

Voluntarios	Número de individuos	Frecuencia (%)	Observaciones
Masculino	18	50	Ninguna
Femenino	18	50	Ninguna
Total	36	100	-----

- *Extracción de la muestra de sangre*
 - a) La toma de muestra de sangre fue periférica, por lo que, se escogieron venas de las extremidades superiores para realizar la extracción.
 - b) Se tomaron 3 tubos al vacío (marca *Vacutainer*®) de 12 ml que contienen una solución ácida de citrato de sodio y dextrosa como anticoagulante. Cada tubo se rotula con el nombre del paciente, su número de registro y probable diagnóstico.

- c) En el laboratorio se le asigna a cada muestra de RVCL un código con las letras RVCL, seguidas de un número consecutivo para que las muestras sean anónimas.
 - d) A continuación, al paciente se le aplica un torniquete en la parte media del brazo. De esta manera, la vena resalta y es posible una mayor precisión en el momento de la punción venosa.
 - e) Se limpió la zona donde se haría la punción venosa con alcohol etílico al 70% (V/V).
 - f) Una vez evaporado el alcohol etílico se realizó la punción venosa utilizando el paquete comercial *Vacutainer*® tomando alrededor de 12 ml de sangre por tubo.
- *Colección de células nucleadas a partir de sangre periférica*
 - a) En un tubo cónico de 15 ml se añade sangre y BLGR (componentes en anexo) en una proporción de 1 ml de sangre por cada 3 ml de BLGR. La solución BLGR contiene en su composición cloruro de amonio (NH_4Cl) el cual puede permear los glóbulos rojos y lisar su membrana plasmática, esta sal en la concentración en la que se encuentra no puede permear fácilmente las células nucleadas de la sangre. De esta manera se separan a los glóbulos rojos de las células nucleadas.
 - b) Se cierra el tubo cónico y se agita la mezcla hasta obtener una mezcla traslúcida homogénea de color rojo.
 - c) Se centrifuga durante 6 minutos a 3000 rpm. Al centrifugar se forma un botón, el cual está compuesto de las células nucleadas que forman parte de la sangre (monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, etc.)

- d) Se desecha el sobrenadante en una solución de hipoclorito al 10% (V/V).
 - e) Se añade 1 ml de BLGR al botón y se homogeniza por pipeteo.
 - f) Se transfiere la mezcla a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
 - g) Se centrifuga durante 2 minutos a 3000 rpm.
 - h) Se desecha el sobrenadante, se agrega 1 ml de BLGR y se centrifuga nuevamente en las condiciones del paso anterior. Se repite este paso hasta obtener botones blancos sin restos de glóbulos rojos. El grupo hemo, el cual contiene iones de hierro, puede afectar las técnicas posteriores que se utilizan para Biología Molecular.
- *Colección de células nucleadas de saliva*
 - a) Se utilizaron colectores de saliva de la marca *ORAgene, Genotek Inc.* Como primer paso se introduce saliva en el dispositivo hasta alcanzar 3 mL de saliva sin contar las burbujas.
 - b) Una vez colectado, se cierra el dispositivo. Se mezcla la saliva con preservadores del DNA dentro del dispositivo.
 - c) Se retira el embudo del tubo y se cierra el tubo.
 - d) Se transfieren 1000 μ L de la mezcla a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
 - e) Se añaden 40 μ L del reactivo *Oragene Purifier* al tubo de microcentrífuga y se mezcla por *vortex* durante 10 segundos.
 - f) Se incuba en hielo por 10 minutos.
 - g) Se centrifuga el tubo a temperatura ambiente a 13000 rpm durante 5 minutos. Se rescata el sobrenadante y se desecha el precipitado.

- h) En proporción 1:1 se añade etanol absoluto y se mezcla con el sobrenadante 10 veces por inversión. Se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la precipitación del DNA.
- i) Se centrifuga la mezcla a 13000 rpm por 2 minutos. Se rescata el precipitado y se descarta el sobrenadante.
- j) Se añaden 150-200 μ L de agua grado inyectable para resuspender el DNA.

- *Conservación de células nucleadas*

- a) Una vez obtenidas las células nucleadas (paso "h" de la colección de células nucleadas a partir de sangre periférica.
- b) Se centrifugan algunos tubos de muestra a 3000 rpm por 6 minutos.
- c) Una vez obtenido el botón, se descarta el líquido sobrenadante.
- d) Se agregan 500 μ L de PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) y 600 μ L de un preservador celular (*RNAlater*, *AMBION*).
- e) Se almacenan a -20.0 °C durante 24 horas para dejar que penetre el agente preservador de las células.
- f) Pasadas las 24 horas, se almacenan los tubos a -70.0 °C en ultracongelador hasta su uso.

- *Extracción de DNA de células nucleadas por salting-out*

- a) Una vez que se obtienen los botones blancos, se agregan 570 μ l de NaCl 0.5mM. Se agita la mezcla durante 2 minutos. Al agregar esta concentración de NaCl se establece un desequilibrio osmótico en el cual el agua entra a la célula para eliminar el desequilibrio. La concentración fisiológica de NaCl es 153 mM.

- b) Se añaden 40 μ l de SDS al 10% (p/v) y se agita la mezcla durante 5 minutos. El SDS (Dodecil sulfato de sodio por sus siglas en inglés) es un compuesto tensoactivo aniónico que permite la solubilización de compuestos hidrofóbicos, de esta manera, se eliminan las membranas plasmáticas y nucleares liberando el DNA.
- c) Se añaden 200 μ l de NaCl 7 M (sobresaturado) y se agita la mezcla durante 10 minutos. En este paso se da un proceso de “*salting out*”. Al haber una cantidad tan alta de sales en el medio acuoso se inicia una competencia por las moléculas de agua. Todos los productos que sean poco hidrosolubles comenzaran a precipitar. El DNA al ser muy hidrosoluble se quedará en la fase acuosa del sistema.
- d) Esta reacción se centrifuga durante 20 minutos a 11500 rpm a una temperatura de 4 °C. El decremento en la temperatura favorece a la solubilidad de los compuestos dentro del tubo de microcentrífuga, por ello, se establece una temperatura baja para eliminar la mayor cantidad de compuestos del medio sin arrastrar al DNA.
- e) Se rescata el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se desecha el botón. Al sobrenadante se le agrega una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (En proporción 49:1 v/v, respectivamente) y se mezcla. Se hace una extracción orgánica en la cual sólo el DNA, las proteínas muy hidrosolubles y los iones se quedan en la fase acuosa del sistema.
- f) Se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 14000 rpm.
- g) Se rescata la fase acuosa en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 ml.
- h) Se añade 1 ml de etanol absoluto. El DNA tiene poca afinidad por los alcoholes, por lo que precipitará al contacto con el etanol.

- i) Se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 14000 rpm.
- j) Se desecha el sobrenadante y se le agrega 1 ml de etanol al 70%. En este paso, se eliminan las sales utilizadas en el proceso de “salting out”.
- k) Se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 14000 rpm.
- l) Se desecha el sobrenadante y se evapora el etanol utilizando un concentrador de vacío (*Speed vacuum* marca Eppendorf). Se concentra la muestra hasta no haber rastros de solvente en el tubo de microcentrífuga.
- m) Se añaden 100-200 μ l de H₂O grado inyectable (libre de nulceasas) y se mezcla la solución en un equipo de agitación con temperatura ajustable durante aproximadamente 1 hora a 50 °C a 900 rpm.
- n) Se obtiene la concentración de DNA utilizando el equipo espectrofotométrico de baja retención Nanodrop 2000 (Figura 11). En este paso se consideraron valores de buena calidad a las lecturas de densidad óptica del factor 260/280 nm \geq 1.8; y del factor 260/230nm entre 1.8-2.0. El factor 260/280 es una relación entre la cantidad de proteína y de ácidos nucleicos en una solución. Los aminoácidos aromáticos en una proteína tienen una máxima absorción de luz a 280 nm, mientras que los ácidos nucleicos tienen su absorción máxima a 260 nm. Un factor igual o mayor a 1.8 sugiere que la muestra contiene una alta cantidad de ácidos nucleicos mayor a la cantidad de proteínas en el medio circundante. Algunos compuestos orgánicos (fenoles, tiazoles, reactivos de los paquetes de extracción) tienen un pico máximo de absorción a los 230 nm, por lo que la relación 260/230 indica si aún existen residuos de los reactivos utilizados en la extracción de ácidos nucleicos.

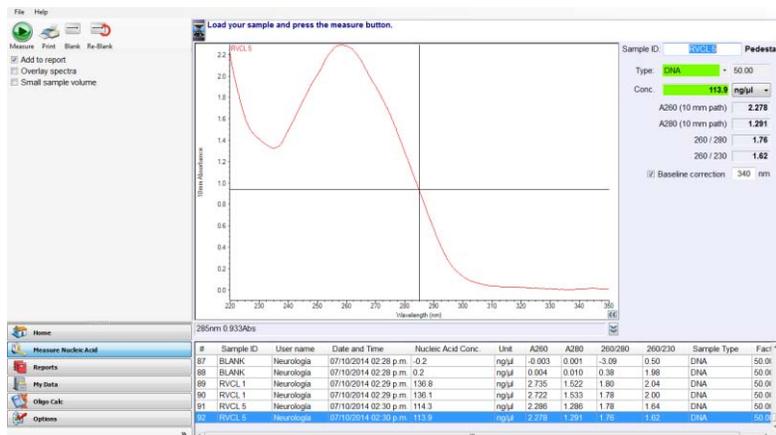


Figura 11: Representación gráfica de la cuantificación de DNA en el equipo Nanodrop 2000

- o) Se sella el tubo de microcentrifuga con una película de parafina, almacenándolo a 4°C hasta su posterior uso.
- p) Se verifica que el tubo contenga código de identificación con número de muestra y sus valores de concentración y calidad espectrofotométrica.
- *Colección y extracción de DNA a partir de cabello (paquete comercial de purificación de DNA genómico de Wizard®, Promega)*
 - a) Por cada muestra de cabello se agregan 500 μL de una solución de lisis de núcleos (paquete comercial *Wizard, Promega*) y 120 μL de EDTA 0.5M a un tubo de centrifuga. Enfriar con hielo durante 10 minutos.
 - b) Se corta cabello a 2 mm empezando por el folículo piloso. Se descarta el exceso. Colocar en tubos de centrifuga de 1.5 mL.
 - c) Se agregan 600 mL de la solución del paso (a).
 - d) Se agregan 17.5 μL de proteinasa K (20 mg/ml).

- e) Se incuba toda la noche a 55°C.
- f) Una vez a temperatura ambiente, se agregan 200 µL de solución de precipitación de proteínas. Mezclar en el vortex a alta velocidad durante 20 segundos. Incubar en hielo durante 5 minutos.
- g) Se centrifuga la muestra a 13000 g durante 4 minutos.
- h) Se rescata el sobrenadante donde se encuentra el DNA en un nuevo tubo de centrifuga de 1.5 mL. Se agregan 600 µL de isopropanol.
- i) Se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 14000 rpm.
- j) Se desecha el sobrenadante y se le agrega 1 ml de etanol al 70% (V/V). En este paso, se eliminan las sales utilizadas en el proceso de "salting out".
- k) Se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 14000 rpm.
- l) Se desecha el sobrenadante y se evapora el etanol utilizando un concentrador de vacío (*Speed vacuum* marca Eppendorf) a temperaturas bajas (30°C). Se concentra la muestra hasta no haber rastros de líquido en el tubo de microcentrifuga.
- m) Se añaden 100-200 µl de H₂O grado inyectable y se mezcla la solución en un equipo de agitación con temperatura ajustable durante aproximadamente 1 hora a 50 °C a 900 rpm.
- n) Se obtiene la concentración de DNA utilizando el equipo espectrofotométrico Nanodrop 2000, como se explicó anteriormente.

- *Amplificación de TREX1 mediante PCR*

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos quiméricos los cuales contienen un fragmento complementario al gen *TREX1* humano y un fragmento en su extremo 3', complementario a la secuencia del bacteriófago M-13 que no tiene homología en todo el genoma humano (Tabla 4).

Tabla 5: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR del exón codificante de *TREX1*.

Oligonucleótido		Secuencia	Observaciones
Cadena (F)	sentido	TGTAAAACGACGGCCAGT	Rojo= secuencia complementaria al Fago M-13
	anti-sentido (R)	ctaggcagcatctaca	
Cadena (R)	sentido	CAGGAAACAGCTATGACC	Negro= secuencia complementaria a <i>TREX1</i>
	anti-sentido (F)	atcctgctagggaag	

- Se hace un dilución de la muestra para obtener una concentración final de aproximadamente 100 ng/μl (75-125 ng/μl) como solución de trabajo.
- En un tubo de microcentrífuga de tamaño apropiado se hace una mezcla maestra de reactivos para la PCR que contiene:

Reactivo	Volumen por reacción (μl)
Mix de PCR "fast" 2X	12.5
Oligonucleótido de hebra sentido <i>TREX1</i> (10 ng/μl)	1.0
Oligonucleótido de hebra antisentido	1.0

TREX1 (10 ng/μl)

H₂O grado inyectable (libre de nucleasas) c.b.p. 24

- c) En un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml se añaden 24 μl de la mezcla maestra del paso anterior y 1 μl de DNA diluido [100 ng/μl].
- d) Se centrifuga la muestra durante 1 minuto a 3000 rpm.
- e) Se introduce el tubo de microcentrífuga en el equipo termociclador (figura 12) y se configura para que reproduzca el siguiente programa de PCR:

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos
10 ciclos	95 °C	15 segundos
	67 °C (-0.5 °C cada ciclo)	15 segundos
	72 °C	15 segundos
30 ciclos	95 °C	15 segundos
	60 °C	15 segundos
	72 °C	15 segundos
Extensión final	72 °C	2 minutos
Refrigeración	12 °C	Tiempo infinito

- f) Se separan los productos de PCR realizando una electroforesis en un gel de agarosa al 2.0% teñido con bromuro de etidio, en amortiguador SB 1X (componentes anexados al final) y se visualizan

en un transiluminador con luz ultravioleta. El producto de PCR deseado tiene un tamaño de 568 pares de bases (pb).



Figura 12: Equipo termociclador utilizado, AB9700.

- *Preparación para la reacción de secuenciación (paquete comercial Big Dye direct, AB)*

A partir de los productos de PCR marcados con el oligonucleótido correspondiente al bacteriófago M-13, se realizó la reacción de secuenciación por el método de Sanger. Al marcar los productos de PCR, se evita la purificación de estos, necesaria cuando aún hay DNA genómico en la muestra. Debido a que las condiciones de reacción para la secuenciación son universales, existe el riesgo de que los oligonucleótidos del gen de interés se unan de manera inespecífica a otra región del genoma humano. En este caso, al tener oligonucleótidos específicos para secuencias de fago M-13, estos no se unirán más que a los productos de PCR marcados con el fragmento del virus.

- a) En un tubo de microcentrífuga de tamaño adecuado se prepara una mezcla maestra que contiene:

Reactivo	Volumen por reacción (μ l)
----------	---------------------------------

<i>Big Dye Direct Master Mix</i> , AB	2.0
Uno de los siguientes reactivos:	1.0
<ul style="list-style-type: none"> Oligonucleótido <i>Big dye Direct</i> M13 de la hebra sentido 	*Oligonucleótidos complementarios al fragmento de bacteriófago M-13
O de la hebra antisentido	

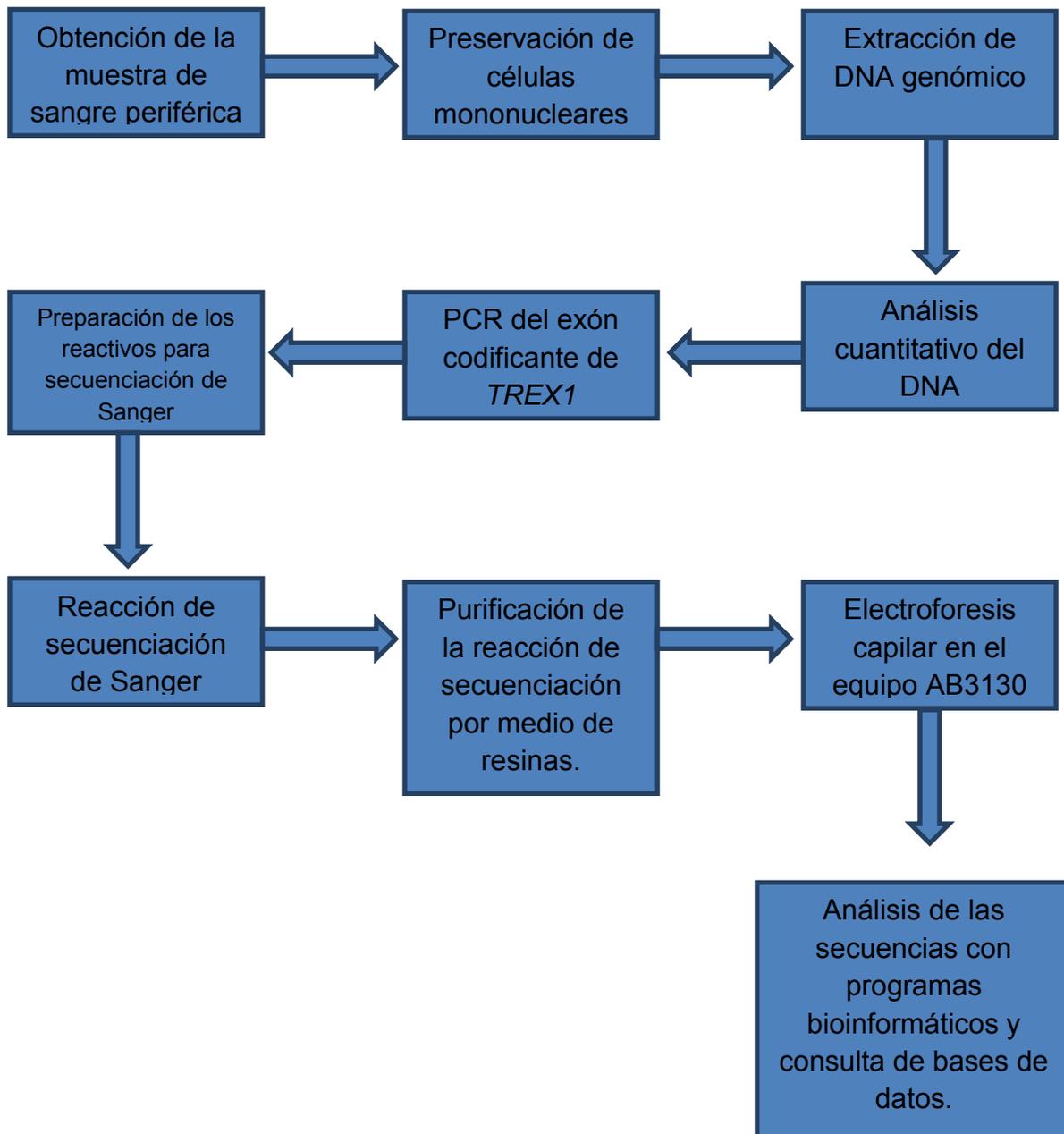
- b) En un microtubo de 0.2 ml se añaden 10 µl del producto de PCR y 3 µl de la mezcla del paso anterior.
- c) Se centrifuga la muestra durante 1 minuto a 3000 rpm.
- d) Se introduce el microtubo con la mezcla de reacción en el equipo termociclador y se configura para que reproduzca el siguiente programa:

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	37 °C	15 minutos
	80 °C	2 minutos
	96°C	1 minuto
Ciclo (25 ciclos)	96 °C	10 segundos
	50 °C	5 segundos
	60 °C	4 minutos
Refrigeración	4 °C	Tiempo infinito

- e) Se almacena el microtubo con el producto de PCR marcado a 4°C protegiéndolo de la luz. Se puede mantener en refrigeración durante una semana antes de su procesamiento para la purificación posterior.
- *Purificación de la reacción de secuenciación con el paquete comercial de Big Dye Xterminator, AB.*
 - a) En una placa para secuenciación de 96 pozos se colocan 10 µl del producto de la reacción de secuenciación.
 - b) Se centrifuga la muestra 1 minuto a 3000 rpm.
 - c) Se agregan 45 µl de solución SAM (S-adenosín metionina) a cada pozo con producto de reacción de secuenciación.
 - d) Se hace un corte transversal a puntas de micropipeta con capacidad de 20-200 µl cerca de la toma de líquido. Estas puntas se utilizarán para agregar el reactivo *Xterminator* ya que es una suspensión demasiado viscosa y se podría obstruir la salida del líquido si la abertura es muy pequeña.
 - e) Se mezcla *Xterminator* en un vortex durante 10 segundos o hasta ver una solución homogénea.
 - f) Se añaden 10 µl de *Xterminator* a cada pozo con solución SAM. Para aspirar el líquido se utilizan puntas de micropipeta de boca ancha como las generadas en el paso “d”. El líquido no debe ser tomado de la superficie. No deben pasar más de dos minutos entre el paso “e” y la incorporación de la solución al pozo. De separarse las fases del *Xterminator* puede volverse a mezclar en vortex.

- g) Una vez añadido se fija la placa a un equipo de agitación de placas. En este caso se utilizó el equipo “*Daigger Vortex Genie 2*”.
- h) Se mezcla la reacción durante 30 minutos en la velocidad 5 del equipo. Después de los primeros 2 minutos revisar que la solución se mantenga homogénea, de no ser así mezclar con pipeta y reanudar la mezcla en el equipo.
- i) Centrifugar la placa durante 2 minutos a 1000 rpm.
- j) Se almacena la placa a 4°C para su posterior análisis en el equipo AB 3130. Si la placa no es procesada en 24 horas se debe sellar con plásticos adhesivos para evitar que se evapore la solución SAM. En caso de secarse, reconstituir con agua desionizada.
- k) Una vez que se procesada la muestra se utilizan los programas bioinformáticos *Sequencing Analisis* v5.3 de AB y *Sequencher* v5.0 de *Genecodes* para el análisis de las secuencias obtenidas. De encontrar mutaciones.
- l) Se hace una comparación de estas secuencias con la secuencia de referencia en la base de datos del NCBI (NM_016381, HGNC:12269, y Q9NSU2 del banco de datos de proteínas). De encontrar mutaciones, se buscó si ya habían sido reportadas en las bases de datos públicas OMIM, NCBI y en HGMDDB.

Diagrama de flujo



RESULTADOS

Se obtuvieron DNAs con una concentración promedio de 150 ng/μL y valores superiores a 1.8 para las relaciones 260/280 y 260/230. Se amplificaron los productos de PCR del exón codificante de *TREX1*, a partir de las condiciones de reacción especificadas en la metodología, previa estandarización del método con tres controles (dos controles provenían del banco de controles del Instituto, y el control comercial CEPH 1347-02 provisto por *AB*). Todas las muestras incluidas en el estudio pudieron amplificarse (N=40 familiares, y 3 DNA controles) sin importar el material de origen. En la Figura 13 se muestra una imagen representativa de la separación por electroforesis de estos amplicones. Esta separación se llevó a cabo, utilizando geles de agarosa (2.0% P/V) con una solución de boratos (concentración en anexo). El primer carril muestra el marcador de pesos moleculares (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermoscientific*). Los siguientes tres carriles representan a un control negativo de la reacción de PCR. A estos, siguen dos carriles con controles positivos en los cuales se utilizó el DNA estándar del paquete comercial de *AB* como templado para la reacción de PCR. Por último, en los últimos dos carriles se encuentra un control positivo en los que se utilizó DNA del banco de controles del departamento de Neurogenética del INNNMVS como templados para la reacción de PCR.

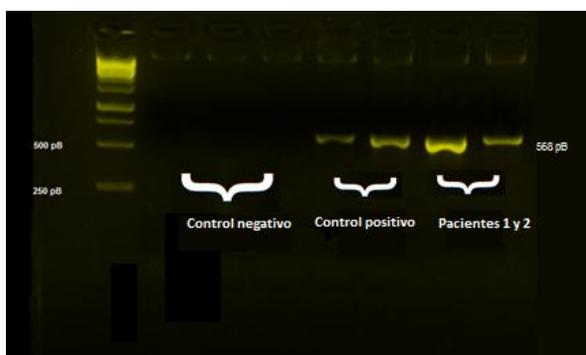


Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR para el exón codificante de *TREX1*, en un gel de agarosa al 2.0% (P/V) en una solución de sales de boro.

Secuenciación

Se realizó la secuenciación de las muestras de DNA de los pacientes y de los 36 voluntarios integrantes de la misma familia. La separación de los productos de la reacción de secuenciación se llevó a cabo en el equipo AB3130. En la Figura 14 se puede observar un ejemplo de un electroferograma de la secuencia del exón codificante del gen *TREX1* como resultado de la separación que realizó el equipo AB3130. Las moléculas fluorescentes que se añaden a los dideoxinucleótidos de la reacción de Sanger emiten radiación de colores diferentes por cada una de las bases nitrogenadas que componen el DNA. De esta manera, el fluorocromo unido a dideoxi-adenina emite una luz color verde, el fluorocromo de dideoxi-citosina emite en azul, la molécula unida a dideoxi-timina emite en rojo y finalmente el fluorocromo unido a dideoxi-guanina emite en amarillo (representado en negro en la figura).

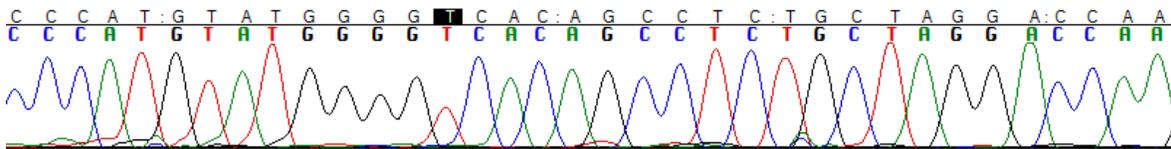


Figura 14: Electroferograma parcial de una secuencia del exón codificante de *TREX1*.

El análisis de la secuencia se realizó con ayuda de los programas bioinformáticos *Sequencing Analysis v5.3* de *AB* y de *Sequencher v5.0* de *Genecodes*. En la tabla 4 se pueden observar la cantidad de sujetos que participaron en el estudio y aquellos que tienen la mutación 3688_3689insG en el gen *TREX1*. Se secuenciaron ambas hebras de DNA y en caso de identificar mutación, el estudio se repitió en muestras independientes de DNA.

Tabla 6: Resumen de los individuos que participaron en el protocolo de diagnóstico de RVCL del INNNMVS

RVCL	Hombres	Mujeres	Heterocigotos para g.3688_3689insG	Individuos con genotipo silvestre
Pacientes	2	1	3	0
Voluntarios	18	18	10 hombres, 7 mujeres	8 hombres, 11 mujeres
Total	20	19	20 individuos	19 individuos

Se puede observar que la muestra consta de un número similar de hombres y de mujeres. Entre los pacientes se tiene el caso de dos hombres y una mujer que ya fueron diagnosticados con RVCL en el INNNMVS. No se encontró ningún caso de mutación en *TREX1* en estado homocigoto. Además, podemos observar el número de individuos que presentan la mutación g.3688_3689insG (p.V235GfsX240). Se utilizó la nomenclatura del HGVS (por sus siglas en inglés *Human Genome Variation Society*, www.hgvs.org) donde g denota que la mutación se encuentra a nivel genómico, ins indica una inserción y G que el nucleótido que se inserta es guanina. El símbolo p se refiere a la secuencia proteica, donde existe un cambio de valina (V) por glicina (G), además fs nos indica que hay un corrimiento en el marco de lectura y que la proteína termina en 240 aminoácidos en vez de los 314 de la proteína silvestre.

Se realizó la secuenciación las muestras de DNA de los pacientes y de los 36 voluntarios integrantes de la misma familia. Como se puede observar en la figura 15, la mutación que presenta esta familia es una inserción de guanina en la secuencia. En todos los casos, esta mutación se encontró en estado heterocigoto lo cual es semejante a lo descrito en la literatura, pues, hasta el momento no se

han descrito casos homocigotos para ninguna de las mutaciones relacionadas con RVCL.

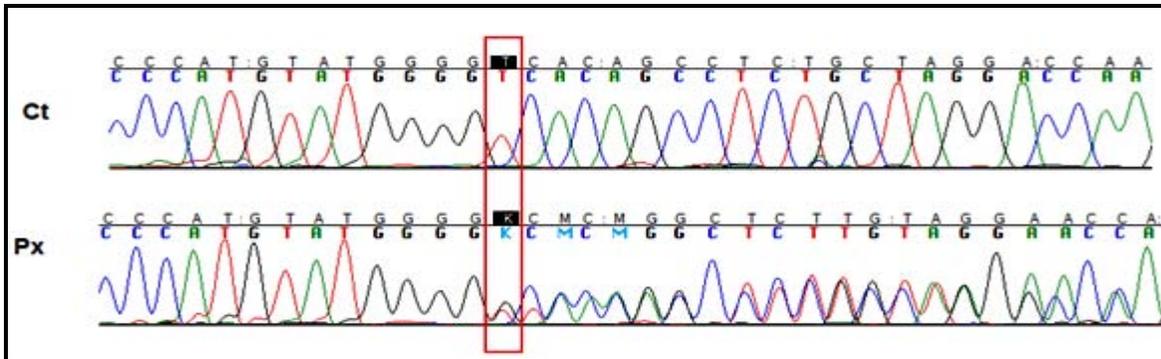


Figura 15: Electroferogramas parciales de la secuencia del exón codificante de *TREX1*. En la parte superior se encuentra la secuencia correspondiente a un control sano del banco de controles del INNNVMS. En la parte inferior se encuentra la secuencia de la muestra de un paciente con RVCL. Encerrado en rojo se encuentra el sitio donde ocurre la inserción de guanina en la posición 3688-3689 del gen. Esta mutación se presenta en la figura en estado heterocigoto, pues se observa que las dos hebras tienen una secuencia diferente después de este punto.

En la Figura 16 se puede observar el cambio en la secuencia primaria de la proteína, donde se puede observar en rojo la secuencia sin cambios y en color verde es sitio donde ocurre la mutación y el cambio en la secuencia proteica debida al corrimiento en el marco de lectura provocada por la inserción antes mencionada.

Proteína silvestre TREX1, 5' a 3'. Marco de lectura 1.

MetGSQALPPGP MetQTLIFFD MetEATGLPFSQPKVTELCLLAVHRCALLESPT
SQGPPPTVPPPPRVVDKLSLCVAPGKACSPAASEITGLSTAVLAAHGRQCFFD
NLANLLAFLRRQPQPWCLVAHNGDRYDFPLLQAELA MetLGLTSALDGAFCV
DSITALKALERASSPSEHGPRKSYSLGSIYTRLYGQSPDPSHTAEGDVLALLSIC
QWRPQALLRWVDAHARPFGTIRP MetYGV TASARTKPRPSAVTTTAHLATTR
NTSPSLGESRGTKDLPPVKDPGALSREGLLAPLGLLAILTLAVATLYGLSLATP
GE Stop

Proteína TREX1 con la mutación p.V235GfsX240, 5' a 3'. Marco de lectura 1.

MetGSQALPPGP MetQTLIFFD MetEATGLPFSQPKVTELCLLAVHRCALLESPT
SQGPPPTVPPPPRVVDKLSLCVAPGKACSPAASEITGLSTAVLAAHGRQCFFD
NLANLLAFLRRQPQPWCLVAHNGDRYDFPLLQAELA MetLGLTSALDGAFCV
DSITALKALERASSPSEHGPRKSYSLGSIYTRLYGQSPDPSHTAEGDVLALLSIC
QWRPQALLRWVDAHARPFGTIRP MetYGV HSLC Stop DQAKTICCHNHCTPGH
NQEHS Stop SQPWREQGYQGSSSSEGPWSPIQGGAAGPTGSAGHPDLGSSHTV
WTIPGHTWGV

Figura 16: Comparación entre la secuencia primaria de la exonucleasa 3' TREX1 silvestre y con la mutación en la posición p.V235GfsX240. Se utilizó la herramienta *translate* de <http://web.expasy.org/translate/>. (Bioinformatics, 2014)

Se hizo un análisis de los síntomas que presentaron los pacientes del INNNMVS. En la tabla 5 se presentan características importantes de los pacientes. En la primera columna podemos observar el número de caso, en la siguiente el género al que pertenecen, podemos observar en la tercera columna la edad a la que iniciaron la enfermedad. Se tiene una columna con los antecedentes familiares de la persona y por último una columna con el síntoma clínico con el cual comenzó la enfermedad.

Tabla 7: Cuadro clínico de los pacientes con RVCL del INNNMVS.

Número de Caso	Género	Edad de inicio (años)	Antecedentes	Síntomas, diagnóstico inicial y evolución
Caso 1	Masculino	51	-Sin tabaquismo -Alcoholismo desde los 17 años de edad	- Infarto retiniano secundario a vasculitis. - Dos años después presenta disminución de la fuerza muscular en miembro pélvico derecho.
Caso 2	Femenino	46	-Tabaquismo (Diez cigarrillos al día) - Alcoholismo social.	-Cefalea holocraneana asociada a náusea y vómito. - Diagnóstico inicial: glioma de alto grado . Fallece un año después.
Caso 3	Masculino	50	Tabaquismo (8 cigarrillos al día, suspendido hace 9 años)	-Parestesias holocraneanas -Disminución de la fuerza en miembro torácico derecho tres meses después. Diagnóstico inicial: esclerosis múltiple .
Voluntarios (36 individuos)	50% masculino, 50% femenino	31± 13	Sin antecedentes	-Sin síntomas de RVCL al momento de la toma de muestra.

Discusión

Las vasculopatías retinianas cerebrales fueron reportadas por primera vez en 1988 (Grand M G y otros, 1988) en una familia con antecedentes de tumores cerebrales, endoteliopatías heredadas, retinopatías, nefropatías, etc. Todos estos signos y síntomas forman parte de un cuadro clínico en el cual están implicadas las mutaciones en la exonucleasa 3'→5', TREX1.

Este estudio representa el estudio de la genealogía con RVCL más grande hasta la fecha y el primer análisis de *TREX1* en pacientes mestizo mexicanos. La mutación identificada en esta genealogía fue g.3688_3689insG. Esta inserción ya había sido previamente documentada por Richards A. y colaboradores (2007) en una gran familia de origen holandés de 110 integrantes con estudios de angiografías (clínicamente publicada por Storimans CW, y otros, 1991) y en dos familias estadounidenses (Richards A y otros, 2007).

La mutación g.3688_3689insG ocasiona el corrimiento del marco de lectura y genera un codón de paro cinco aminoácidos después de la mutación (p.V235fsX240) (Figura 16). Este mismo grupo de investigación, realizó los estudios de expresión de la proteína truncada y demostró que ésta conserva la actividad de nucleasa, pero pierde su localización normal (Richards A, y otros, 2007). La proteína mutante carece de todo el dominio transmembranal que permite su localización en el espacio perinuclear, provocando la difusión a través del citoplasma. Es posible que esta alteración también evite que TREX1 interactúe con el complejo enzimático SET inhibiendo la vía de la granzima A de apoptosis celular (Chowdhury D y otros, 2006).

Adicionalmente, se ha demostrado que la región carboxilo terminal de TREX1 controla la localización celular por medio de ubiquitinación que involucra aminoácidos (Lisina 230) cercanos al sitio de mutación (Orebaugh y otros, 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, RVCL es una enfermedad rara en la cual están comprometidos los vasos sanguíneos pequeños. En los casos sintomáticos con RVCL que cuentan con historia clínica en el INNNMVS, se observó la variabilidad fenotípica intrafamiliar pues los primeros síntomas variaron considerablemente. La alteración que presentaron los tres casos durante su evolución fueron los problemas vasculares en la retina (Tabla 7). Una coincidencia interesante en dos de estos casos, es el consumo de tabaco. El paciente dos, que hasta el momento de la toma de muestra aun consumía tabaco, inició con los síntomas graves de RVCL a los 45 años de edad. En el paciente que no consumía tabaco, la enfermedad debutó a los 50 años de edad con síntomas oftalmológicos. Por otro lado, el consumo de alcohol podría estar relacionado con la evolución de RVCL, pues el caso 3 que no consume alcohol es el que se encuentra en mejores condiciones. Estos hallazgos podrían sugerir que el consumo de tabaco y/o alcohol podría modular los efectos tóxicos de la mutación de *TREX1* en el organismo al aumentar la inestabilidad genómica de las células y por lo tanto aumentando los sustratos de los mecanismos de reparación celular como lo es esta exonucleasa (Moinuddin y otros, 2014) (Kruman I I y otros, 2012). Hacen falta estudios en una población más grande que analicen estos y otros factores ambientales para confirmar esta hipótesis.

Con respecto a la variabilidad fenotípica en los pacientes estudiados (cases 1, 2 and 3) y considerando la penetrancia completa de esta mutación en *TREX1*, se puede inferir que esta es una combinación de varios factores como lo son: factores genéticos (polimorfismos en genes que controlan la expresión de *TREX1*), cambios epigenéticos, factores ambientales como los que observamos en estos pacientes (diferencias en sus estilos de vida) e interacciones genética-ambiente.

Las mutaciones de herencia heterocigota en *TREX1* son capaces de causar diferentes cuadros clínicos (Figura 3) dependiendo de su localización y el tipo de mutación (Tabla 2). Este efecto de heterogeneidad alélica sugiere que estudios más profundos de RVCL nos permitirá hacer una correlación genotipo-fenotipo más certera, que este basada en las mutaciones específicas de *TREX1*. Estos estudios podrían ayudar a crear nuevas pruebas clínicas, y otras herramientas de diagnóstico, además de, ayudarnos a entender mejor las bases moleculares de las vasculopatías de pequeños vasos.

En la Tabla 5 se ilustran los diagnósticos erróneos que recibieron dos de los pacientes estudiados. El caso 2 recibió diagnóstico inicial de glioma de alto grado, el caso 3 fue diagnosticado como esclerosis múltiple. En el caso 1 se hizo la prueba molecular dirigida de *TREX1*, pues ya había sido confirmado el diagnóstico de RVCL en su hermano (caso 3). Los resultados en esta entidad con expresividad variable y de difícil diagnóstico, ilustran la utilidad de la secuenciación del gen para un diagnóstico confirmatorio y concluyente de RVCL.

En relación al diagnóstico inicial erróneo del caso 2 es importante resaltar que el tratamiento de estos pseudotumores en RVCL (*tumors like*) no está claro hasta la fecha. En el caso 3 se dió un diagnóstico inicial de esclerosis múltiple, por lo que se iniciaron los siguientes tratamientos: intercambio de plasma, tratamiento con inmunoglobulinas, e inmunosupresión crónica; sin embargo, no tuvieron efectos que indicaran una evolución diferente de la enfermedad. Este tipo de tratamientos ya han sido usado antes, de manera experimental, para tratar RVCL (Mateen F J y otros, 2010). RVCL es una enfermedad letal, de la cual no se conoce una cura a la fecha. Sin embargo, en el caso 3 resulta muy interesante que el uso de la molécula de interferón beta en su tratamiento, parece haber retardado la evolución de la enfermedad. En la literatura, se ha observado que el interferón beta (Inf- β) tiene una actividad de regulador positivo en la expresión de *TREX1* (Xu J, y otros,

2014). En cierta forma, esto abre la posibilidad de investigar nuevos tratamientos para esta entidad devastadora e investigar más a fondo de qué manera esta molécula interactúa o modula la actividad de la exonucleasa en cuestión.

Suponemos que en Ixtapan de la Sal existe un mayor número de individuos en riesgo que no participó en el presente estudio, ya que la familia cuenta con al menos 384 integrantes a lo largo de cuatro generaciones, de los cuales sólo se analizaron 39 individuos. La población en la comunidad de Ixtapan de la Sal en 1950 era de 7616 habitantes y el último censo en el 2010 reveló que la población de Ixtapan de la Sal constaba de 33 541 habitantes (INEGI, 2010). Esto nos indica que la población aumentó cuatro veces su tamaño durante ese período de tiempo. De manera que probablemente la RVCL también ha aumentado en la población de Ixtapan de la Sal y algunos de los casos de neuro-vasculopatías en la región podrían explicarse por mutaciones en *TREX1*.

Tomando en cuenta el tamaño de la población, el modo de herencia de RVCL (autosómico dominante), y la presencia de consanguinidad en la genealogía, sugiere fuertemente la sospecha de un efecto fundador de la mutación g.3688-3689insG de *TREX1* que pudiera explicar la alta incidencia de RVCL en la región. Para comprobarlo, se requiere hacer otro tipo de estudios como estudios de ancestría biogeográfica.

En aproximadamente la mitad de los familiares voluntarios estudiados se identificó la mutación de *TREX* (Tabla 6). Diecisiete familiares fueron portadores de la mutación pero no presentaban manifestaciones clínicas al momento del estudio. Sin embargo, por razones éticas se decidió que únicamente se darían resultados de la prueba molecular a las personas cuando ya presentaran síntomas de la enfermedad y desearan conocer sus resultados. De lo contrario, sería diagnóstico predictivo no solicitado y esto atentaría contra la autonomía de cada una de las

personas participantes. Por lo anterior, para conocer los resultados de la prueba molecular, los participantes del estudio podían acudir al laboratorio de Genética del Instituto o vía telefónica, llamar para concertar una cita con el médico genetista. Hasta ahora, sólo tres casos portadores de la mutación son sintomáticos y ya conocieron sus resultados moleculares. De igual forma estos pacientes ya recibieron el asesoramiento genético correspondiente y se les brindará un seguimiento continuo en el Instituto.

Durante el estudio, al analizar la genealogía extendida de la familia (Anexo 2), se observó la presencia de dos uniones consanguíneas en las que ambos progenitores son portadores de la enfermedad (hasta ahora asintomáticos) y ya tienen descendencia (Anexo 2). Por cuestiones éticas no se tomaron muestras biológicas de la descendencia, ya que son menores de edad. Esto último expone un dilema ético para los genetistas debido al aumento en el riesgo de herencia que implica para la descendencia (Tabla 8). Cada hijo de un individuo con RVCL tiene un 50% de probabilidad de heredar la variante patogénica, pero en parejas donde ambos padres son portadores el riesgo aumenta a 75%, con la posibilidad de un genotipo homocigoto mutante. Hasta la fecha, no se han reportado casos de RVCL con un genotipo homocigoto mutante de *TREX1* y no sabemos si este es viable. Por ello se mantendrá una constante comunicación con la familia y se tendrá una especial atención en la descendencia de los individuos con relaciones consanguíneas.

♂	♀	A	a
A		AA	Aa
a		Aa	aa

Tabla 8: Cuadro de Punnett para 2 individuos portadores heterocigotos con el alelo que produce RVCL. La letra “A” representa el alelo mutado y “a” el alelo

silvestre. Debido a que la enfermedad se hereda en forma autosómica dominante, el riesgo para la descendencia es del 75%, contra un 25% de que el producto no sea portador de la enfermedad.

RVCL es una enfermedad que comparte muchas características con la enfermedad de Huntington en el ámbito bioético. Estas dos enfermedades se presentan en la etapa adulta, son de herencia autosómico dominante y hasta la fecha no existen tratamientos para su curación.

Tomando en cuenta la amplia experiencia del departamento de Genética en el programa del diagnóstico predictivo de la enfermedad de Huntington y que RVCL presenta las mismas cuestiones bioéticas (Alonso ME, 2002), debemos considerar:

- Toma de decisión del individuo afectado en cuanto a su descendencia y propagación de la enfermedad.
- Edad del individuo al realizar la prueba, y predicción de la aparición de los síntomas. En este sentido, otra pregunta sería: ¿Es ético que menores de edad se hagan la prueba, aún cuando se sabe que al menos uno de los padres se encuentra afectado?
- ¿Existe obligación por parte del individuo o de su médico, para alertar a su familia de la presencia de la enfermedad cuando hay resultados positivos?. La respuesta a esta pregunta puede ser más fácil cuando existen tratamientos preventivos para la aparición de la enfermedad. Sin embargo, en la enfermedad de Huntington y en RVCL, como ya se ha mencionado, no existe un tratamiento (Norrgard K., 2008).

Para este desorden neurológico se pretende realizar un asesoramiento genético que requiere de la participación de un equipo multidisciplinario en el cual se deben incluir: Genetistas, neurólogos, psiquiatras, psicólogos y trabajadores sociales. Para poder realizar un diagnóstico prenatal de la enfermedad en embarazos

subsecuentes es necesario que ya haya sido identificada una mutación persistente en la familia que explique la enfermedad. Las pruebas predictivas se realizarán conforme a las guías internacionales propuestas por la Federación Mundial de Neurología para la enfermedad de Huntington. Finalmente, se incluirán pláticas educativas para el cambio de hábitos de vida que puedan permitir retrasar la aparición de síntomas de la enfermedad.

El presente trabajo resalta la importancia de la prueba molecular en el diagnóstico de RVCL. El estudio molecular en pacientes con sospecha clínica de RVCL evita gastos en la solicitud de estudios innecesarios (incluyendo biopsias invasivas de cerebro), acorta tiempos de espera y elimina diagnósticos erróneos (angiopatías amiloideas, encefalopatías mitocondriales con acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares, esclerosis múltiple, leucodistrofia del adulto, entre otras).

Los resultados de este trabajo permitirán otorgar diagnóstico preciso de RVCL y brindar asesoramiento genético a los pacientes y sus familiares. Asimismo, se dará seguimiento a los familiares y se prepara un plan de acción para orientar a los individuos mayores de edad en riesgo (pláticas de educación con especialistas), en cuanto a cambios de hábitos y estilo de vida que retrasen el inicio de la enfermedad o permitan modificar su curso. También se les ha comunicado a los participantes que deseen conocer su resultado que se planea abrir el programa de diagnóstico presintomático para el análisis de *TREX1*.

Conclusiones

Los tres casos de pacientes relacionados con sospecha clínica de RVCL fueron confirmados por medio de la prueba molecular del gen *TREX1*. En los tres pacientes se identificó la mutación p.V235GfsX240 previamente reportada, que se encuentra en el dominio transmembranal de la proteína y afecta su localización.

Diecisiete de los 36 voluntarios presentaron la mutación p.V235GfsX240. Estos resultados representan un dilema ético, debido a que existen relaciones consanguíneas donde los dos individuos son portadores y tienen descendencia.

La prueba molecular permitió dar un diagnóstico certero para la enfermedad. Esta prueba es barata, acorta tiempos y es una técnica no invasiva comparada con otros estudios de imagen y laboratorio que no dan una visión clara de la enfermedad.

Perspectivas

Debido a la alta prevalencia de la mutación en la genealogía estudiada, que presenta uniones consanguíneas es posible que haya un efecto fundador de la mutación en la comunidad. Este trabajo puede ampliarse a una muestra de mayor tamaño en personas con síntomas vasculares en la comunidad de donde es originaria la familia.

Recursos Electrónicos

Bioinformatics, S. I. (2014). *ExpASy*. Recuperado el 2014, de <http://www.expasy.org/>

Biorad. (2014). *Biorad*. Recuperado el 17 de Septiembre de 2014, de <http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/pcr-reagents-purification>

Conserved Domains. (2014). *NBCI*. Recuperado el 14 de Diciembre de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/?term=TREX1>

Medline Plus, B. N. (2014) *Medline Plus*. Recuperado el 08 de Agosto de 2014, de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/>

Ensembl. (2014). *Ensembl*. Recuperado el 29 de Agosto de 2014, de <http://www.ensembl.org>

Fisher Scientific. (2014). Recuperado el 08 de Septiembre de 2014, de http://www.fishersci.com/ecom/servlet/fsproductdetail_10652_14622069-1_0

Genetics Home References. (2014). Recuperado el 29 de Diciembre de 2014, de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TREX1>

Kolker E, H. R. (2012). MOPED: Model Organism Protein Expression Database. Nucleic Acids. Recuperado el 29 de Agosto de 2014, de <https://www.proteinspire.org/MOPED/mopedviews/proteinExpressionDatabase.jsf>

OMIM. (2014). Recuperado el 01 de 09 de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OnlineMendelianInheritanceinMan>. (2014). Recuperado el 19 de 07 de 2014, de <http://omim.org/entry/192315>

PROTEIN DATABANK. (2014). Recuperado el 26 de Septiembre de 2014, de <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2O4I>

STRING - Known and Predicted Protein-Protein Interactions. (2014). Recuperado el 26 de 07 de 2014, de <http://string-db.org/>

Recursos Bibliográficos

- Alonso ME, Yescas P, Rasmussen A, Ochoa A, Macías R, Ruiz I, & Suástegui R. (2002). Homozygosity in Huntington's disease: new ethical dilemma caused by molecular diagnosis. *Clinical Genetics*, Volume 61. 437-442.
- Barizzone N, Monti S, Mellone S, Godi M, Marchini M, Scorza R, Danielli MG, & D'Alfonso S (2013). Rare Variants in the TREX1 Gene and Susceptibility to Autoimmune Diseases. *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 471703, 6 pages.
- Brooks PJ, Cheng TF, Cooper L. (2008). Do all of the neurologic diseases in patients with DNA repair gene mutations result from the accumulation of DNA damage? . *DNA Repair*. Volume 7.6.1. 834-848.
- Cortez D, Guntuku S, & Elledge S. (2001). ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling. *Science*, Volume 294 no. 5547 pp. 1713-1716.
- Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung Y, Demple B, Perrino FW, and Lieberman J. (2006). The Exonuclease TREX1 Is in the SET Complex and Acts in Concert with NM23-H1 to Degrade DNA during Granzyme A-Mediated Cell Death. *Molecular Cell*, Volume 23. 133-142.
- Federico A, Di Donato I, Bianchi S, Di Palma C, Taglia I, Dotti MT. (2012). Hereditary cerebral small vessel diseases: a review. *Journal of the neurological sciences*. 25-30
- Grand MG, Kaine J, Fulling K, Atkinson J, Downton SB, Farber M, Craver J, and Rice K. (1988). Cerebroretinal vasculopathy. A new hereditary syndrome. *Ophthalmology*, 649-659.
- Kavanagh, D., Spitzer, D., Kothari, P. H., Shaikh, A., Liszewski, M., Richards, A., y otros. (2008). New roles for the major human 3'-5' exonuclease TREX1 in human disease. *Cell cycle*, 1718-1725.
- Kruman I I, Henderson GI, Bergeson SE. (2012). DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Experimental Biology and Medicine*, volume 237. 740-747.

- Lindahl T, Barnes DE, Yang YG, Robins P. (2009). Biochemical properties of mammalian TREX1 and its association with DNA replication and inherited inflammatory disease. *Biochemical Society Transactions*. 535-538
- Mateen F. J., Krecke Q., Younge B. R., Ford A. L., Shaikh A., Kothari P. H., Atkinson J. P. (2010); Evolution of a tumor-like lesion in cerebroretinal vasculopathy and *TREX1* mutation. *Neurology* 75. 1211-1213
- Mazur DJ, Perrino FW. (1999). Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases. *The Journal of Biological Chemistry*. 19655-19660
- Moinuddin, Ahmad S DK, Shahab U, Habib S, Naim M, Alam K, Ali A. (2014). Human DNA damage by the synergistic action of 4-aminobiphenyl and nitric oxide: an immunochemical study. *Environmental Toxicology vol 29*. 568-576.
- Norrgard, K. (2008). Ethics of Genetic Testing: Medical Insurance and Genetic Discrimination. *Nature Education*, 1.
- Perrino, D. J. (2001). Structure and Expression of the TREX1 and TREX2 3' to 5' exonuclease genes. *The journal of biological chemistry*, 276, 14718-14727.
- Richards A, Magleenberg A, Jen J, Kavanagh D, Bertram P, Spitzer D, *et al* (2007). C-terminal truncations in human 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nat Genet*, 37, 1068-1070.
- Ophoff RA, DeYoung J, Service S, Joosse M, Caffo N, *et al*. (2001). Hereditary Vascular Retinopathy, Cerebroretinal Vasculopathy, and Hereditary Endotheliopathy with Retinopathy, Nephropathy, and Stroke Map to a Single Locus on Chromosome 3p21.1-p21.3. *Am. J. Hum. Genet*, 447-453.
- Orebaugh CD, Fye JM, Harvey S, Hollis T, Wilkinson JC, Perrino FW. (2013). The TREX1 C-terminal region controls cellular localization through ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry*. 28881-28892.
- Storimans CW, Schooneveld V, Oosterhuis JA, & Boos PG. (1991). A new autosomal vascular retinopathy syndrome. *Eur J Ophtal*, 1, 73-78.
- Strachan T, & Read AP. (2011). *Human molecular genetics* (4° edición ed.). Garland Science.

Xu J, Zoltick H, Gamero AM, & Gallucci S (2014). TLR ligands up-regulate Trex1 expression in murine conventional dendritic cells through type I Interferon and NF-kB-dependent signaling pathways. *Journal of Leukocyte Biology*, 96, 93-103.

Yamamoto Y, Craggs L, Baumann M, Kalimo H, & Kalaria R (2011). Review: Molecular genetics and pathology of hereditary small vessel diseases of the brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, Vol 37, 94-113.

ANEXO I. Componentes de soluciones.

BLGR (pH final= 7.4)

Cloruro de amonio (NH_4Cl): 0.16 M

Carbonato ácido de potasio (KHCO_3): 0.01 M

Ácido etil-diamino-tetra-acético (EDTA): $1 \cdot 10^{-4}$ M (pH=8.0)

Solución de boratos

Ácido bórico (H_3BO_3): c.b.p. pH=8.0

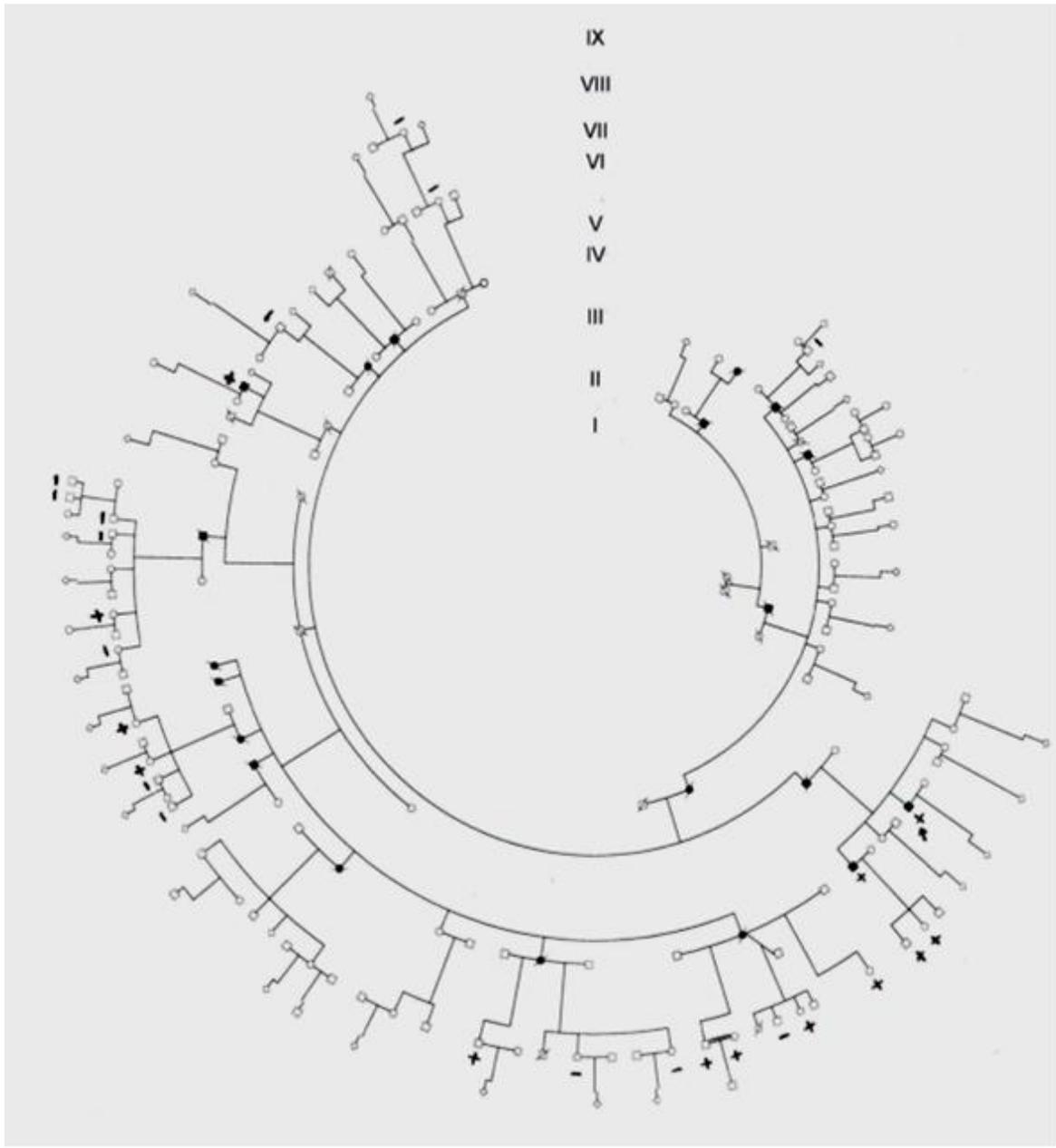
Hidróxido de sodio (NaOH): 0.01 M

ó

Borato de sodio decahidratado= 0.005M

Fuente: Broody J.; Kern S. Biotechniques (2004) 36. 214-216.

ANEXO II. Árbol genealógico.



Genealogía parcial de la familia en este estudio. Los signos positivos se refieren a individuos que resultaron positivos para la mutación p.V235Gfs240 . Los signos negativos indican que no se encontraron mutaciones en el individuo al hacer el análisis molecular.

ANEXO III. Consentimiento informado pacientes

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA “MVS”

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VASCULOPATÍA RETINIANA CON LEUCODISTROFIA



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Fecha: ____/____/____

He sido informado que padezco o algún familiar padece vasculopatía retiniana con leucodistrofia, esta enfermedad se caracteriza por una alteración de los vasos sanguíneos pequeños que ocasionan una inadecuada irrigación, lo que afecta diferentes órganos, en particular retina y cerebro, seguidas de daño renal y hepático. Es un padecimiento hereditario por lo que es frecuente que haya otros miembros de su familia con la misma enfermedad.

El objetivo de este estudio es confirmar a nivel molecular la presencia del gen que ocasiona la enfermedad en personas que ya tienen síntomas de la misma, así como estudiar personas sanas pertenecientes a la misma familia.

PROCEDIMIENTOS A REALIZARSE

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.

Es importante mencionar que solo se darán resultados a personas que ya tienen síntomas del padecimiento.

EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS

Cuando la sangre es obtenida, usted podrá experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.

BENEFICIOS PARA LAS PERSONAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

Su participación en este estudio permitirá realizar el diagnóstico preciso de la enfermedad presente en su familia.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

El estudio de su muestra no tendrá ningún costo para usted.

Si usted considera que los puntos antes mencionados no están claros, o le surgen nuevas dudas puede dirigirse directamente con las responsables de este estudio. Las personas responsables son la Dra. Ma. Elisa Alonso, Dra. Nancy Monroy, Dr. José de Jesús Flores y la M. en C. Adriana Ochoa del departamento de Neurogenética y Biología Molecular y se puede comunicar con cualquiera de ellas al Tel. (55) 56 06 38 22 Exts. 2022 y 2018.

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 y/o familiar: _____

Firma del paciente y/o familiar: _____

Nombre y firma del Responsable legal: _____

Dirección _____ **y**

Teléfono: _____

Testigo (parentesco)

Testigo (parentesco)

Nombre y firma de quien obtuvo el consentimiento

ANEXO III. Consentimiento informado controles

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MVS”

Consentimiento para participar en la investigación de la estructura genética de la población mexicana

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Fecha: ____/____/____

1. He sido informado(a) que en el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este instituto se están realizando estudios para determinar las variaciones en genes (que son las unidades de la herencia) en personas, aparentemente sanas, de la población mexicana.
2. Los genes que se van a estudiar son los siguientes: *APOE*, *ATX*, *HTT*, *CYP2D6*, *NAT*, *PARK2*, *PSEN1*, *VHL*, *MTHFR*, *FXN*, *MAPT*, *APT* y *TREX1*. Estos genes pueden presentar variantes (polimorfismos) cuya frecuencia varía en diferentes poblaciones.
3. He sido informado(a) que para analizar estos genes es necesario que done una muestra de 20 mL de sangre periférica para que de ahí se extraiga el DNA que es el material hereditario y se estudien los genes antes mencionados.
4. He sido informado(a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción.
5. He sido informado(a) que se me hará un árbol genealógico y se me preguntará acerca de las enfermedades que he padecido así como las de mi familia.
6. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de números y letras para proteger mi identidad.
7. He sido informado(a) que mi participación en este estudio es **VOLUNTARIA** y no tiene costo alguno para mí, ni recibiré remuneración alguna.
8. Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado por los investigadores para saber si deseo conocer la información y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuados.
9. He sido informado(a) de la garantía que tengo para recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a dudas que surjan respecto a los asuntos relacionados con esta enfermedad.
10. Para cualquier duda o aclaración puede dirigirse al Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este instituto con la Dra. Ma. Elisa Alonso y con la Lic. Adriana Ochoa o comunicarse al Tel 56063822 Ext 2022 y 2018, respectivamente. En caso de así requerirse, los pacientes también pueden acudir al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 56 06 38 22 ext. 5027

Nombre del participante: _____ **Género:** H M

Firma: _____ **Teléfono:** _____

Correo electrónico: _____

Dirección: _____

Origen: _____ **Edad:** _____ **Fecha de Nacimiento:** __/__/__

Ocupación: _____

Edo. Civil: _____ **Escolaridad:** _____

Testigo

Testigo

Nombre del (la) investigador(a) que obtuvo el consentimiento: _____

Firma : _____