



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
Luis Guillermo Ibarra Ibarra  
ESPECIALIDAD EN:

***Genética Médica***

***ANÁLISIS DE LA LONGITUD RELATIVA DE TELÓMEROS EN  
LEUCOCITOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE  
HUNTINGTON***

**T E S I S**

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

***GENÉTICA MÉDICA***

**P R E S E N T A:**

*Adriana Perez Grovas Saltijeral*

PROFESOR TITULAR

*Dra. Margarita Valdés Flores*

ASESOR

*Dr. Alberto Hidalgo Bravo*



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.

---

**DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL**  
DIRECTORA DE EDUCACIÓN EN SALUD

---

**DRA. XOCHIQUETZAL HERNANDEZ LOPEZ**  
SUBDIRECTORA DE EDUCACIÓN MÉDICA

---

**DR. ROGELIO SANDOVAL VEGA GIL**  
JEFE DEL SERVICIO DE EDUCACIÓN MÉDICA

---

**DRA. MARGARITA VALDES**  
PROFESOR TITULAR

---

**DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO**  
ASESOR CLÍNICO

---

**DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO**  
ASESOR METODOLÓGICO



# Agradecimientos



# INDICE

1. Resumen	9
2. Introducción	11
3. Objetivo	33
4. Material y métodos	35
I. Población de estudio	35
II. Variables	37
III. Extracción del ADN	38
IV. Medición de la Longitud del telómero	38
i. Estandarización de la técnica de qPCR	40
ii. Determinación de la eficiencia de la reacción	41
V. Análisis de LT en los grupos de estudio	52
VI. Análisis estadístico	58



5. Resultados	60
6. Discusión	72
7. Referencias bibliográficas	78

## RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo, caracterizado por manifestaciones neuropsiquiátricas, motoras y deterioro cognitivo, los afectados fallecen en los primeros 20 años posteriores al diagnóstico. Esta causada por una expansión del trinucleótido CAG en el gen *HTT*. En esta patología se ha encontrado daño al ADN relacionado con estrés oxidativo, principalmente secundario a rupturas de doble cadena (DSB). Las DSB son reparadas en los telómeros mediante replicación inducida por ruptura (BIR). Sin embargo BIR puede llevar a un acortamiento telomérico y provocar su disfunción, lo que lleva a inestabilidad cromosómica y finalmente muerte celular.

El objetivo de éste proyecto es investigar si existe una correlación entre la longitud telomérica y la progresión de la enfermedad, la edad de diagnóstico y/o el número de repetidos CAG en los pacientes con EH.

La investigación fue realizada en colaboración con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). Se analizaron XX pacientes con diagnóstico confirmado

de EH y con presencia de sintomatología. Además de integró un grupo de pacientes con confirmación de la mutación sin sintomatología y un grupo control de individuos negativos para la mutación. La medición de la longitud relativa de los telómeros se hizo en leucocitos de sangre periférica mediante PCR en tiempo real en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Se realizó el análisis estadístico.

Palabras clave: Huntington, enfermedad neurodegenerativa, longitud relativa telomérica, telómero, repetido de trinucleótidos.

## Introducción

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que generalmente aparece en la edad adulta. La EH afecta tanto a nivel cognitivo como musculo esquelético. Se caracteriza por presentar manifestaciones neuropsiquiátricas, cognitivas y motoras y es considerada la enfermedad monogénica neurológica más frecuente (Fisher & Hayden 2014). Tiene una prevalencia mundial estimada, con base en datos clínicos, de 5.7 por 100,000 individuos. Sin embargo, el diagnóstico molecular ha demostrado una frecuencia mayor, llegando a ser de 1 en 7300 en Europa, con tasas menores en Asia (Chao et al, 2017). Según datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, en México existen alrededor de 8 mil pacientes reportados con diagnóstico de enfermedad de Huntington. Sin embargo, esta cifra parece estar subestimada, ya que se menciona que por las características discapacitantes de la enfermedad son pocos los pacientes que acuden a consulta médica en busca de un diagnóstico. El inicio de las manifestaciones clínicas tiene una edad promedio de entre 30 y 50 años, aunque cuenta con un rango de 2 a

85 años. La enfermedad es progresiva y la muerte ocurre entre 17 y 20 años después del diagnóstico (Roos 2010).

La primera descripción clínica fue realizada en 1872 por George Huntington, gracias a la experiencia adquirida a través de su padre y abuelo, ambos médicos. Publicó su reporte con el título “On chorea” en Ohio, describiendo las características clínicas y un modo de herencia autosómico dominante (G. Huntington 1872). Dentro de las características neurológicas, notó que los pacientes presentaban cambios en la personalidad, así como el deterioro cognitivo clásicamente descrito. A mediados de 1950, el médico venezolano Americo Negrette reportó la existencia de una población en Maracaibo, Venezuela, afectada por la EH, también conocida como “El mal de San Vito” en dicha localidad. Sus reportes fueron corroborados por André Barbeau y colaboradores (expertos en desordenes del movimiento), en Montreal, Canadá en 1973. Durante la misma investigación se mostró que todos los afectados en Maracaibo, descendían de una misma mujer, María Concepción Soto, quien vivió ahí a principios del siglo XVIII y quien habría heredado el gen de un marino

europeo (Kalyan B. Bhattacharyya 2016). Más de 100 años después, en 1983 se mapeo el gen *HTT* en el cromosoma 4p, gracias al trabajo de D. Housman, J. Gusella y N.S. Wexler mediante RFLPs (restriction fragment-length polymorphisms) analizados en una de las familias de Maracaibo (Gusella J.F. et al 1983). En 1993 el equipo “Huntington's Disease Collaborative Research Group” identifico el locus específico en 4p16.3. Posteriormente, mediante el método de atrapamiento de exón, el grupo “Huntington's Collaborative Research Groups” identificó la etiología molecular, la expansión del repetido trinucleotido CAG dentro del marco de lectura, en el exón 1 del gen *HTT* (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Así mismo, se demostró que la longitud del repetido CAG tiene una relación inversamente proporcional con la edad de inicio de la EH (Duyao, M. et al 1993). En 1996 Rubinsztein y colaboradores lograron la caracterización fenotípica del gen según el número de repetidos CAG. Se estableció como alelos sanos a los repetidos en un rango de 6-35 y como alelos con alta penetrancia causantes de EH a los iguales o mayores de 40. El rango entre 36 y 39 repetidos confiere un riesgo elevado de presentar la enfermedad a

lo largo de la vida. Sin embargo, hay individuos dentro de este rango que no presentan la EH (Rubinsztein, D. C. et al 1996). Observaciones posteriores demostraron que el tracto de repetidos puede cambiar de longitud de una generación a la siguiente, por lo que se consideró inestable. A pesar de que esta inestabilidad de repetidos es muy variable entre generaciones, se observó que ocurre con mayor frecuencia por transmisión paterna, debido a la variación en el número de repetidos en los espermatozoides. El fenómeno de anticipación, que presenta la EH, se conoció en 1998, con la característica de presentarse únicamente a través de herencia paterna (Ridley R. M., Frith, C. D., Crow, T. J. & Conneally, P. M 1988). Este fenómeno se refiere a la presentación de una enfermedad genética autosómica dominante a edades más tempranas y de forma más severa conforme pasa de una generación a la siguiente. Es un fenómeno que se presenta típicamente en las enfermedades debidas a expansión de repetidos de trinucleótidos (NIH/GHR 2018). El número de repetidos de CAG confiere alrededor del 70% de la variabilidad en la edad de inicio de las manifestaciones, con lo que aún hay un 30% de ésta que

será conferida por otros factores tanto genéticos como ambientales.

El gen *HTT* codifica para la proteína Huntingtina, y fue en 1995 que se relacionó su función como esencial para la embriogénesis (Nasir, J. et al 1995), en SNC (sistema nervioso central) y en tejidos periféricos. En el mismo año se realizó la descripción de la estructura proteica, previamente anticipada por Max Perutz por contener repetidos de poliglutamina auto-asociados en forma de beta plegada mediante uniones de hidrogeno (Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. & Finch, J. T 1994). Una vez que se localizó el gen *HTT*, se tuvo la posibilidad de realizar análisis predictivo para portadores de la mutación. En 1989 se publicaron las primeras guías internacionales para realizar el análisis predictivo debido a las implicaciones éticas que conlleva. Dichas guías fueron revisadas en 1994 por la Asociación Internacional de Huntington y el grupo de la Federación Mundial de Investigación Neurológica en Corea de Huntington 1994).

Al ser una enfermedad con causa molecular conocida y de etiología monogénica, se esperaría que las



probabilidades de tratamiento fueran mayores y mejores que en otras enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la limitante del desarrollo de estrategias de neuroprotección para la EH es que éstas se intentan una vez que el proceso degenerativo ya está demasiado avanzado. En esta enfermedad se ha observado la presencia de signos y/o síntomas previos a la aparición de las manifestaciones clásicas de la enfermedad, es decir en la fase pre-motora de la EH. El deterioro motor se puede valorar mediante la escala unificada de la enfermedad de Huntington (Unified Huntington's Disease Rating Scale), dicha escala puede incluso detectar de forma estadísticamente significativa cambios en la fase pre-motora. Sin embargo, pocas veces se realiza en ésta fase, ya que no suele tenerse un diagnóstico en estas etapas (especialmente sin antecedentes familiares). Esto ha llevado a la búsqueda de marcadores diagnósticos con relación a la neurodegeneración, que permitan el inicio del tratamiento de carácter preventivo (Samuel D. Kim, Victor S.C. Fung 2014). Se han investigado distintos tipos de marcadores: cognitivos, conductuales, clínicos, de neuroimagen y neurofisiología (Kim and Fung 2014), y actualmente de biomarcadores. Los marcadores

cognitivos se basan en que el deterioro de dicha área puede ser detectado incluso desde 15 años previos al diagnóstico; en un estudio realizado por Tabrizi SJ, Reilmann R, Roos RA, y cols (TRACK-HD) se demostró deterioro en el volumen cerebral, predominantemente en el núcleo caudado y putamen desde la fase pre-motora (Tabrizi SJ et al, 2013). Los marcadores de neuroimagen y neurofisiología han surgido debido a que se han observado cambios funcionales neuronales (mediante análisis computacional con PET) que inician desde 20 años previos a la expresión clínica de la enfermedad (Samuel D. Kim, Victor S.C. Fung 2014). En cuanto a los marcadores biológicos estudiados en la EH se han buscado aquellos relacionados con estrés oxidativo, ya que se ha comprobado la relación entre la huntingtina mutada y la disfunción mitocondrial (Ergün Sahin 2011).

Se ha descrito la interacción de la proteína mitocondrial “proteína relacionada a dinamina 1” con la huntingtina mutada (mHTT), lo que resulta en defectos en el transporte anterógrado mitocondrial y con ello degeneración sináptica selectiva (Shirendeb UP, Calkins MJ, Manczak M, et al 2012). Otro mecanismo de degeneración sináptica propiciado por la presencia de la

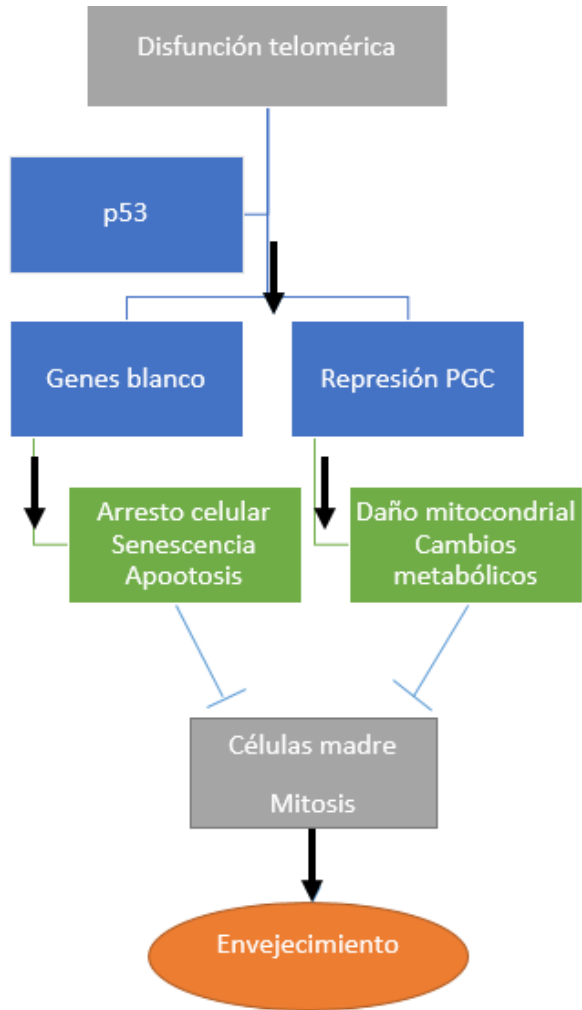
mHTT es por su interacción con la membrana mitocondrial externa, lo que resulta en defectos en la producción de ATP, en la función del calcio como amortiguador y en la apoptosis. Con esta alteración en la producción de ATP hay una reducción en la capacidad de transporte de las mitocondrias hacia los sitios de sinapsis, donde hay una alta demanda de energía. Por lo tanto, la interacción de la mHTT con la mitocondria propicia una sinapsis deficiente, lo que se traduce en daño neuronal. (M. Jimenez-Sanchez et al. 2017). Una de las funciones biológicas de la HTT silvestre, es promover la transcripción del factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF, siglas en ingles), neurotrofina ampliamente involucrada en la sinapsis neuronal. Por lo que ante una mHTT, esta transcripción se ve alterada de forma negativa, resultando en daño neuronal y neurodegeneración. La presencia de una mHTT también se ha visto en relación con pérdida de la función de la enzima que sintetiza la cisteína, la cual mantiene la homeóstasis mitocondrial. (M. Jimenez-Sanchez et al. 2017). También se ha visto que la mHTT reduce la actividad enzimática de la cadena respiratoria, particularmente del complejo II y IV (Maria Damiano, 2010);

Además, la HTT también interviene en la regulación de genes relacionados con la función mitocondrial, dentro de los que se encuentran *PGC-1 $\alpha$*  y *PGC-1 $\beta$*  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1), co-activadores nucleares que regulan la expresión de genes involucrados en la cadena respiratoria y biogénesis mitocondrial (necesario para el metabolismo energético). Se ha observado que la mHTT actúa como represor transcripcional de *PGC-1 $\alpha$*  y *PGC-1 $\beta$* ; la inhibición de este factor propicia la neurodegeneración (Libin Cui, 2006) (Shirendeb U, et al 2011). En la regulación de estos genes también participan los telómeros (Figura 1): la disfunción telomérica activa p53, quien a su vez se une y reprime a los promotores de *PGC-1 $\alpha$*  y *PGC-1 $\beta$* , propiciando disfunción mitocondrial y arresto celular, lo que conlleva a muerte celular (Nicky Pietersa, et al 2015) (Sahin E, et al 2011). Demostrando una relación entre la función mitocondrial y los telómeros (Libin Cui, 2006).

Todo lo anterior en conjunto genera disfunción mitocondrial. Dentro de las consecuencias más

importantes de la disfunción mitocondrial, está la producción aberrante de especies reactivas de oxígeno (EROS), lo que a su vez generará más daño mitocondrial. Se ha observado evidencia de daño oxidativo en tejido cerebral de pacientes (post mortem) con EH. Esta observación se ha corroborado en modelos murinos, donde se encontró elevación de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa mitocondrial, catalasa y carbonilos protéicos, respectivamente (Sorolla et al. 2008).

Estas enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (y por lo tanto con disfunción mitocondrial) y los datos de disfunción telomérica (como acortamiento de su longitud) pueden ser útiles como biomarcadores de degeneración (P. Thomas, 2008), y aplicarse en el diagnóstico y prevención de enfermedades asociadas a neurodegeneración como la EH.



Adaptado de: Sahin, E. et al. 2011

**Figura -1** Activación de p53 por disfunción telomérica, generando unión y represión de los promotores de *PGC-1α* y *PGC-1β*. Esto provoca disfunción mitocondrial y arresto celular, lo que conlleva a muerte celular; se inhibe la proliferación y diferenciación de células madre, y finalmente se presenta envejecimiento celular

Los telómeros son secuencias repetidas del hexanucleotido (TTAGGG), situados en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Una de sus principales funciones es prevenir que los extremos cromosómicos sean reconocidos como rupturas de doble cadena (DSB) y procesados por la maquinaria de reparación del daño al ADN. De esta manera los telómeros mantienen la estabilidad genómica evitando pérdida de regiones subteloméricas y fusiones terminales de los mismos (Palm W, and de Lange T, 2008). Fisiológicamente los telómeros sufren acortamiento de entre 50-150 pares de bases por cada ciclo de replicación celular. El acortamiento es secundario enteramente a problemas durante la replicación, generados por su estructura, a este fenómeno se le conoce como problema de la replicación de los extremos (End Replication Problem) (Harley CB, 1990) Sin embargo, esto es únicamente válido para las células somáticas, ya que las células germinales, células madre y células tumorales cuentan con un sistema de mantenimiento de longitud telomérica para evitar que se alcance una longitud crítica. Dicho sistema se encuentra estructurado por la ribonucleoproteína Telomerasa (TERT), mediador principal de la síntesis de repetidos

teloméricos (Wong and Collins, 2003). Las células somáticas, al carecer de TERT, tienen una capacidad limitada para restaurar la longitud telomérica una vez que se ha visto acortada como consecuencia de errores de replicación u otros mecanismos inducidos por estrés oxidativo (Von Zglinicki, 2000). Cuando los telómeros son demasiado cortos la célula lo detecta mediante la disminución en la cantidad de proteínas de unión a telómero, y entonces pierde su capacidad de replicación. Con lo que se entiende que el acortamiento telomérico limita el número de veces que una célula se puede dividir y tiene entonces un mecanismo similar a supresor tumoral (Reddel RR, 2003).

Los eventos que ocurren en el telómero pueden estar en relación con la fisiopatología de la EH a través de varias vías. Una de ellas por ganancia de función tóxica de la proteína HTT anormal, aunada a la pérdida de la función de la proteína HTT normal. La mHTT se acumula al sufrir un plegamiento anormal, generando toxicidad celular y con ello disfunción de las vías de degradación proteica (proteasoma-ubiquitina, y autofagia), lo que



conlleva a un ciclo de acumulo proteico e inevitable disfunción y muerte celular.

Como consecuencia de la generación de EROs, se ha observado daño al ADN tanto mitocondrial como nuclear. Entre los eventos más dañinos para el ADN se encuentran las DSB. En el telómero las DSB suelen repararse por mecanismos como la replicación inducida por ruptura (RIR) (Heyer WD et al. 2010). En contraste con el resto de las regiones cromosómicas donde el mecanismo más usado y menos propenso a error es la reparación por recombinación homóloga mediante la vía de síntesis dependiente de alineación de cadena. La RIR es útil para mantener la integridad y funcionalidad de la estructura telomérica, sin embargo, puede resultar en una reducción de la longitud del telómero. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica y no pueden ser reparados se presenta inestabilidad cromosómica, ya que se pierde la capacidad de protección contra las fusiones terminales de los cromosomas y se generan procesos de fusión-ruptura cromosómica. Estos eventos pueden llevar a apoptosis y en algunos casos a potenciales cambios neoplásicos (Wei W et al. 1999). En el contexto de

enfermedades neurodegenerativas se han identificado distintos factores externos relacionados con la producción de EROs y con el consecuente daño al ADN (mismas que pueden generar acortamiento telomérico). Entre dichos factores se encuentran: tabaquismo, obesidad, altos niveles de homocisteína, estrés tanto fisiológico como psicológico y el género. Se ha visto que la eficiencia del mantenimiento de la longitud telomérica se ve afectada según el género (femenino/masculino) (O'Callaghan 2011).

Los eventos que ocurren en el telómero pueden estar en relación con la fisiopatología de la EH a través de varias vías. Una de ellas por ganancia de función tóxica de la proteína HTT anormal, aunada a la pérdida de la función de la proteína HTT normal. La mHTT se acumula al sufrir un plegamiento anormal, generando toxicidad celular y con ello disfunción de las vías de degradación proteica (proteasoma-ubiquitina y autofagia), lo que conlleva a un ciclo de acumulo proteico e inevitable disfunción y muerte celular.

La senescencia celular prematura asociada al acortamiento telomérico y por consiguiente, la muerte celular temprana; son características comunes de las enfermedades degenerativas. Por lo tanto, se sugiere la longitud telomérica puede ser un marcador de muerte celular temprana. Es por esto, que la longitud telomérica puede considerarse como un marcador indirecto de la presencia de una enfermedad degenerativa. La longitud telomérica ha sido asociada con un mayor riesgo de infarto al miocardio, sobrevida de cáncer de mama, sobrevida de cáncer renal de células claras, mortalidad post infarto cerebral, demencia y deterioro cognitivo; así como con sobrevida total (independiente de otros factores genéticos) (O'Callaghan 2011). Los cambios en la longitud del telómero han sido asociados con envejecimiento y con algunas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (P. Thomas et al 2008).

Con base en lo anterior se puede desarrollar un modelo que explica la muerte celular en la enfermedad de Huntington como consecuencia de: acortamiento telomérico y toxicidad por acumulo de la Mhtt (Figura 2). A

continuación, se explica de forma esquemática la interacción de estas dos vías:

1. La mHTT genera toxicidad por acumulo (propiciando con ello envejecimiento y muerte celular) e interactúa con reguladores de transcripción de genes mitocondriales.
2. Inactivación de genes reguladores de la función mitocondrial
3. Disfunción mitocondrial.
4. Aumento y desregulación de EROS.
5. Daño oxidativo.
6. Daño telomérico.
7. Acortamiento telomérico.
8. Envejecimiento y muerte celular

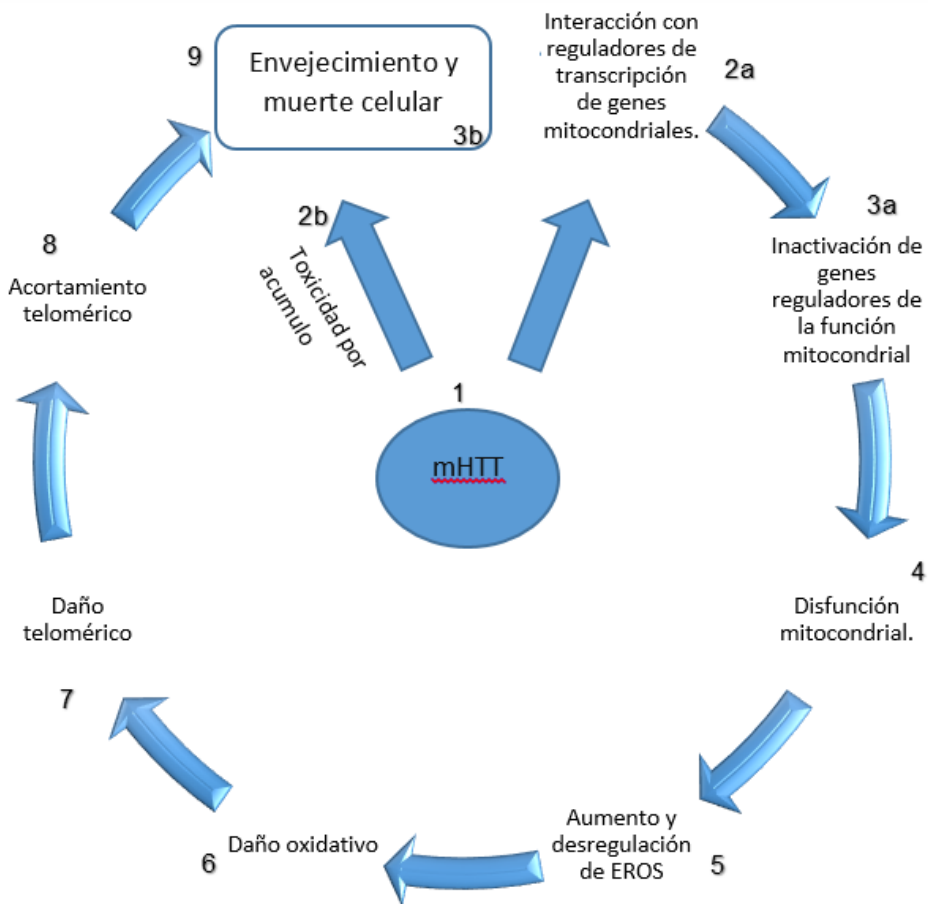


Figura 2. Modelo propuesto sobre la fisiopatología de la muerte celular en la Enfermedad de Huntington

Como se ha comentado la EH se acompaña de muerte celular prematura. Se ha visto la asociación entre la muerte celular prematura y el acortamiento de la

longitud de telómeros, pudiendo considerarse a este último como un marcador de patología celular en enfermedades neurodegenerativas (Lakshmi Narayanan Kota et al 2015).

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un ejemplo bien estudiado de un síndrome de envejecimiento celular prematuro, que afecta especialmente a células neuronales. Se ha estudiado la relación de biomarcadores de inestabilidad genómica en AD y entre otros, como la presencia de micronúcleos, aneuploidias (del 21) y acortamiento telomérico. En dichos estudios, se realizó análisis de la longitud telomérica en pacientes con AD comparando con población sana, mediante análisis de fragmentos de restricción terminal (TRF), y se observó una relación indirecta entre la longitud telomérica y la progresión de la enfermedad (Panossian et al. 2003).

Dentro de la misma línea, distintos autores han realizado análisis experimentales para correlacionar la longitud absoluta de los telómeros en leucocitos de pacientes con AD vs controles pareados por edad, en uno de ellos se realizó mediante el método de Cawthon

modificado. Se encontró una longitud telomérica significativamente más corta en el grupo de casos comparado con el de controles. Vale la pena recalcar que la diferencia de la longitud entre estos grupos no se observó en la comparación intergrupos por edad de AD. Es decir que hay una diferencia en la longitud telomérica entre sanos y enfermos, pero no se entre enfermos de distintas edades. Esto sugiere que el factor principal que modifica la longitud telomérica es el estado (enfermo o sano), con un mayor peso que las variabilidades individuales. A su vez, concluyeron que el ADN de los leucocitos es una medida más sensible para detectar las diferencias de la longitud telomérica entre casos (pacientes con AD) y controles, comparada con células de mucosa oral. (P. Thomas et al 2008).

Estudios previos sobre la relación de la longitud telomérica con enfermedades neurodegenerativas han sido realizados principalmente en pacientes con demencia, Parkinson y Alzheimer. Existe un estudio realizado en pacientes con Huntington, en este estudio (Kota et al 2015) se analizaron 35 pacientes con la enfermedad de Huntington ya con cambios clínicos y se

realizó una comparación tanto con grupos controles (sin expansión) como con casos con demencia y ataxia telangiectasia con sus respectivos controles. Los resultados mostraron una relación inversa entre la longitud y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, los autores sugieren extender el estudio a una población más grande. Además, proponen la posibilidad de que el acortamiento telomérico suceda incluso antes del inicio de los síntomas en los pacientes con la expansión para Huntington.

Se han creado diferentes metodologías para realizar la medición de la longitud telomérica, entre la que se encuentran el TRF (“estándar de oro”) mediante hibridación con sondas de secuencias teloméricas de ADN genómico posterior a la digestión con enzimas de restricción. El FISH (hibridación in situ fluorescente) con citometría de flujo. El FISH cuantitativo con sondas fluorescentes y la reacción en cadena de polimerasa (PCR), éste último mide la longitud del telómero (TL) mediante qPCR (PCR en tiempo real,). La qPCR se basa en el método de Cawthon para la medición relativa de la TL (O’Callaghan, 2011). A excepción del TRF (que da una



medida absoluta), todas las otras metodologías dan una medida relativa de la longitud del telómero. Sin embargo, la ventaja de la qPCR, es que necesita pequeñas cantidades de ADN, y es realizada mediante formatos de altos rendimiento, lo que es ideal para estudios epidemiológicos (O'Callaghan, 2011).

## Objetivo

Investigar si existe una relación entre la longitud del telómero y la progresión de la EH, el tiempo de evolución con la EH desde el diagnóstico y/o tamaño del repetido CAG en el gen *HTT*

### Objetivos Específicos

- Analizar la longitud relativa de los telómeros en leucocitos de pacientes con enfermedad de Huntington, en portadores de la mutación de Huntington asintomáticos y en personas sanas del mismo rango de edad que los pacientes.
- Identificar si existe alguna correlación de la longitud telomérica relativa de los leucocitos, en los pacientes enfermos de Huntington, con la edad de inicio de la sintomatología.
- Comparar la longitud relativa de los telómeros en leucocitos de individuos sanos (sin la mutación), contra la de los pacientes enfermos de Huntington del mismo rango de edad y sexo.
- Comparar la longitud relativa de los telómeros en leucocitos de los enfermos de Huntington contra la de

portadores de la mutación de Huntington asintomáticos, del mismo rango de edades y sexo.

- Identificar si existe alguna correlación de la longitud telomérica relativa de los leucocitos en los pacientes enfermos de Huntington con la severidad de la enfermedad y con el número de repetidos CAG.
- Contribuir con el conocimiento del mecanismo molecular subyacente al daño celular observado en estos pacientes.

## **Material y métodos**

La investigación fue realizada en colaboración con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), se usó el registro de individuos con prueba molecular para la Enfermedad de Huntington, en quienes se conoce el número de repetidos de CAG, a partir de dicha información se seleccionaron los grupos controles y los casos. La medición de la longitud de los telómeros se hizo en leucocitos de sangre periférica, mediante PCR en tiempo real. La extracción y almacenamiento de los ácidos nucleicos se realizó en el INNN. La qPCR se hizo con el equipo que se encuentra en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

Tipo de diseño: Transversal, descriptivo, analítico.

### **I. *Población de estudio***

Se realizó el estudio en pacientes del INNN que contaran con el diagnóstico molecular positivo para EH (más de 40 repetidos CAG). Como controles se utilizaron dos grupos; el primero fueron familiares de los enfermos diagnosticados mediante la prueba molecular que contaran con el estudio predictivo positivo para la

expansión de CAG pero que a la fecha de la muestra fueran asintomáticos. Y el segundo grupo control aquellos con estudio predictivo negativo para la expansión de CAG.

### **1.1 Grupos de estudio**

Se clasificó a los individuos en 3 grupos:

- A. Grupo de interés: individuos con datos clínicos de EH que cuenten con el estudio molecular positivo para EH y que se cuente con ADN disponible en el INNN, desde 1997.
  
- B. Dos grupos controles:
  - I. Individuos a quienes se les realizó el estudio predictivo para EH y que obtuvieron un resultado positivo, pero son asintomáticos al momento de la toma de la muestra.
  
  - II. Individuos a quienes se les realizó el estudio predictivo para EH y que obtuvieron un resultado negativo.

## **II. Variables**

<b>Variable</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Escala de medición</b>
Longitud relativa telómero	Numérica	Cuantitativa continua
Estatus	Nominal	PN, PP, EH
Tiempo de evolución	Numérica	Cuantitativa discreta
Edad a la toma de muestra	Numérica	Cuantitativa discreta
Sexo	Nominal	Cualitativa nominal
Herencia	Nominal	Cualitativa nominal
Alelo	Numérica	Cuantitativa discreta
Tabaco	Nominal	Cualitativa nominal

### **III. Extracción de ADN**

- Las muestras de los individuos de los 3 grupos fueron etiquetadas un código, el cual se registró en una base de datos del INNN.
- La extracción de ADN se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el kit Pure Gene (Qiagen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- El ADN fue cuantificado y analizado mediante el biofotómetro BioDrop-lite (BioDrop). El ADN se preparó en diluciones a 10 ng/ $\mu$ l
- Las muestras fueron enviadas al INR para su análisis

### **IV. Medición de la longitud del telómero**

La longitud relativa del telómero se obtuvo mediante PCR en tiempo real de acuerdo al método descrito por Cawthon (Cawthon 2009). Este método desarrollado por Cawthon demostró una alta correlación con otros métodos para medir la longitud telomérica como el fragmento de restricción de telómeros (TRF) y el método de

amplificación de telómero sencillo (STELA) (Cawthon 2009, Baird DM et al. 2003). Además, cuenta con la ventaja que no necesita el uso de radioactividad. Este método obtiene una longitud media de los telómeros de un individuo.

Se utilizó un par de oligonucleótidos que alinean con los repetidos canónicos del telómero (TTAGGG) para generar un fragmento de longitud fija (Tabla 1), a mayor longitud del telómero se genera un mayor número de amplicones. Para el cálculo de la longitud de los telómeros se utilizó un gen de copia única como referencia común a las muestras analizadas, en este caso el gen de la albúmina. El diseño de los oligonucleótidos permite que la amplificación se realice en tiempo real y los amplicones se detecten con SBYR Green. Al amplificar la región de interés y la de referencia en la misma reacción se previene el error de añadir una cantidad desigual de ADN en las reacciones de amplificación. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado y se realizó una réplica técnica por muestra. La estimación de la longitud del telómero se hace mediante una curva estándar para cada uno de los amplicones y posteriormente se obtiene



una relación entre el valor del ciclo umbral (Ct) del amplicón con repetidos teloméricos y el gen de referencia

Tabla 1. Secuencia de los Oligonucleótidos

---

**Telómero**

Tel G 5'-acactaaggtttgggtttgggtttgggtttgggttagtgt-3'

Tel C 5'-tgtaggtatccctatccctatccctatccctatccctaaca-3'

**Albúmina**

Albu 5'-cggcggcgggcgggcgggctgggcggaatgctgcacagaatccttg-3'

Albd 5'-gcccggcccgcgcccgtcccggaaaagcatggtgcctgtt-3'

---

#### **IV.1 Estandarización de la técnica de qPCR**

En la primera etapa del experimento se realizó la estandarización de la técnica de PCR tiempo real (qPCR), utilizando el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) (Figura 3). Para ello se utilizaron muestras de ADN del banco del INR de individuos sin datos de enfermedad neurológica. La longitud telomérica se estimó mediante el *Método de Cawthon*, obteniendo una longitud relativa de los telómeros. Para conocer la eficiencia de la reacción de PCR, se realizó una curva estándar y posteriormente se

analizaron las curvas de disociación para distinguir los productos de amplificación del gen control contra el gen de interés y descartar la presencia de productos de PCR inespecíficos. En esta curva se representa la temperatura de la reacción a la cual se logró la desnaturalización del amplicón.

## ***IV.2 Determinación de la eficiencia de la reacción***

### **Curva estándar**

Se emplearon 5 diluciones (Tabla 2) de una concentración inicial de ADN de un individuo sano, se realizó qPCR para el gen control y el gen de interés. Se utilizó el gen de la Albumina como control por ser un gen de copia única, se espera que todos los sujetos tengan sólo dos alelos por genoma. Para la detección de los amplicones se utilizó SYBR Green; un fluoróforo que se asocia e interactúa con ADN de doble cadena y emite fluorescencia bajo luz Ultra Violeta. La fluorescencia emitida se mide al término de cada ciclo de amplificación para determinar la cantidad de ADN amplificada. Por lo

que esta curva se utiliza para la cuantificación del material genético en métodos como qPCR.

*Tabla 2. Diluciones de ADN de individuo sano, para la realización de la curva estándar*

Diluciones= factor de dilución 1:2, iniciando con una concentración de 25 ng/μl.

D1	D2	D3	D4	D5
50 ng/μl	25	12.5	6.25	3.12

Para los experimentos de qPCR se utiliza el valor Ct (Cycle Threshold), medición de los ciclos necesarios para alcanzar un umbral de fluorescencia (que representa la amplificación del ADN). Considerando que a mayor concentración de ADN menor será la cantidad de ciclos necesaria.

Se realizaron 3 reacciones por cada dilución, tanto para albumina como para telómero, para obtener un promedio de Ct por dilución. Se prosiguió a la preparación del Master Mix (Tabla 3) para la reacción qPCR, uno para Albumina (control) y otro para Telómero.

Tabla 3 Componentes de la preparación de Master Mix por reacción:

	X1
SYBR (2x)	5µl
ADN	2µl(7.5ng/ml)
Primer (Tel C/Albu) 10µM	0.5µl
Primer (Tel G/Albd) 10µM	0.5µL
Rox	0.02µL
dH2O	1.98µL
TOTAL	10µL

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

ETAPA	CICLOS	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	10min
Desnaturalización / Amplificación	35	95°C 54°C	15seg 2min
Curva de disociación		95°C 60°C 60-95°C 95°C	15seg 1min +0.3°C 15seg

Se ajustaron las temperaturas, tiempo y ciclos para la qPCR de acuerdo a las condiciones establecidas (Figura 3).

Posteriormente se graficó el Ct contra la cantidad total de ADN (ng) contenida por cada reacción, con lo que se obtiene una curva estándar (Figura 2). Se generaron 2 curvas estándar, una para la Albumina y otra para el telómero. La pendiente de esta gráfica determina la eficiencia de la amplificación, dando una eficiencia de 99.52 del gen de interés (telómero) y de 107.68 del gen de referencia (albumina). Es importante mencionar que en los experimentos de qPCR se considera aceptable un rango de eficiencia de 90-110%. Por lo tanto, podemos demostrar que nuestras reacciones tienen una eficiencia adecuada.

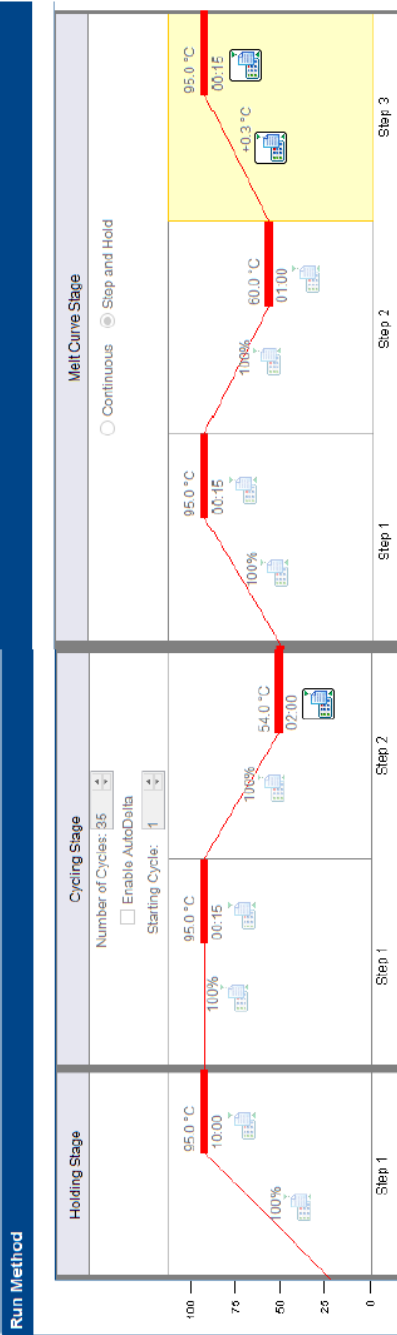


Figura -3 Etapas de la qPCR (Desnaturalización / Amplificación/curva de disociación) con las condiciones de tiempo y temperatura específicas de cada ciclo

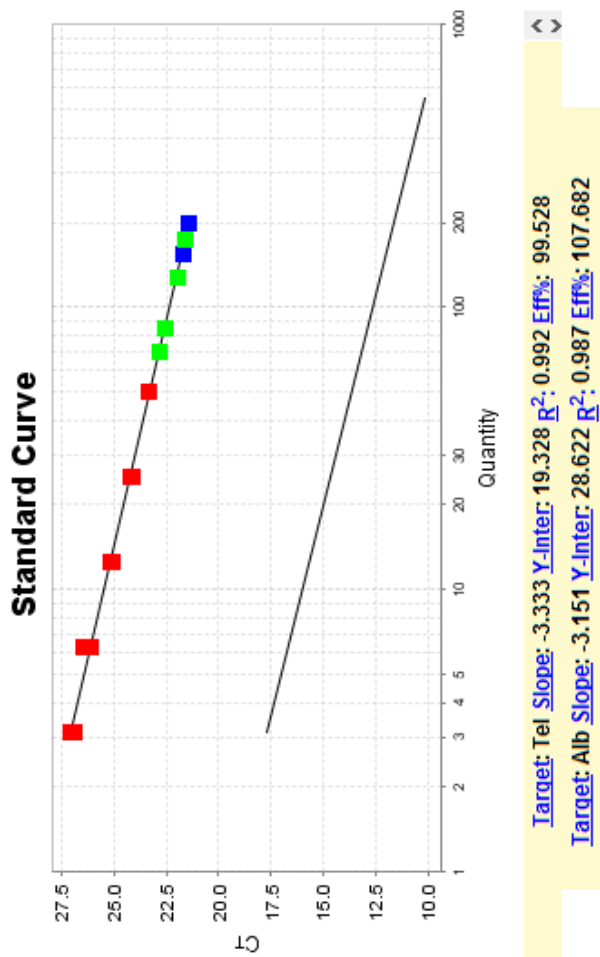


Figura 4. Curva Estándar. Ct contra ADN (ng). Se determina la eficiencia de la amplificación: Eficiencia de Telómero 99.5, Eficiencia de Albumina 107.6. Ambas eficiencias adecuadas. Arriba tal y abajo

Para establecer la concentración de cada muestra de ADN, se realizó la cuantificación por medio del BioDrop-lite. Se prepararon diluciones de ADN por cada muestra a una concentración estándar de 7.5ng/ml. A fin de obtener 15ng totales por reacción.

La reacción se realizó por triplicado para cada muestra, para obtener un Ct promedio. Se analizó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :

- Este método se utiliza en PCR tiempo real para comparar la abundancia de moléculas específicas (gen de interés, en este caso Telómero y de referencia, en este caso Albumina) en distintas muestras.
- Delta CT: diferencia entre el Ct del gen de interés (telómero) menos el Ct del gen de referencia (albumina) en la misma muestra.
- Se obtiene entonces un delta Ct por cada muestra  
→1: muestra 1; 2: muestra 2. T: telómero, A: albumina



$$\text{Delta Ct 1} = \text{CtT1} - \text{CtA1} \quad \text{Delta Ct 2} = \text{CtT2} - \text{CtA2}$$

El Delta-delta CT es la diferencia del Delta CT de la muestra de interés, menos el Delta CT de la muestra calibrador.

### Delta Ct2-Delta Ct1

#### *Curva de disociación*

Las curvas de disociación se realizan para distinguir los productos de amplificación del gen control contra el gen de interés, así como para descartar la presencia de productos de PCR inespecíficos. En esta curva se representa la temperatura de la reacción a la cual se logró la desnaturalización del ADN. Cada fragmento de ADN producido por la reacción es graficado. Teniendo por entendido que el fragmento de ADN mayor necesitará una temperatura más alta para lograr la disociación, en tanto que el fragmento menor que necesitará menos temperatura (figura 5-7).

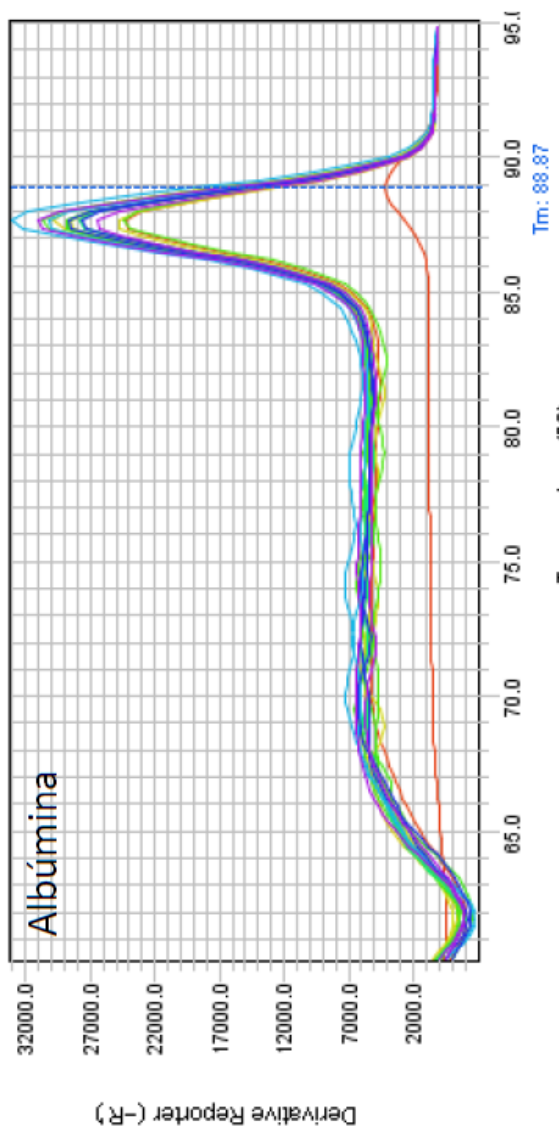


Figura-5 Curva de disociación del gen control. Se observa la temperatura de la reacción de la ADN de la albúmina en la que se desnaturaliza el ADN de la albúmina

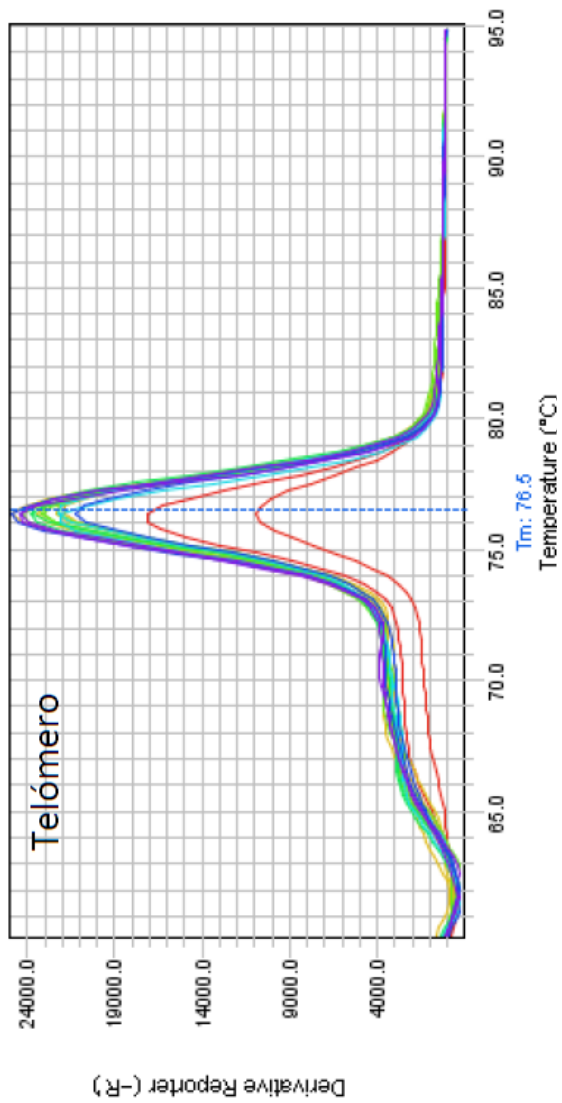


Figura-6 Curva de disociación del gen de interés. Se observa la temperatura de la reacción en la que se desnaturaliza el ADN telomérico

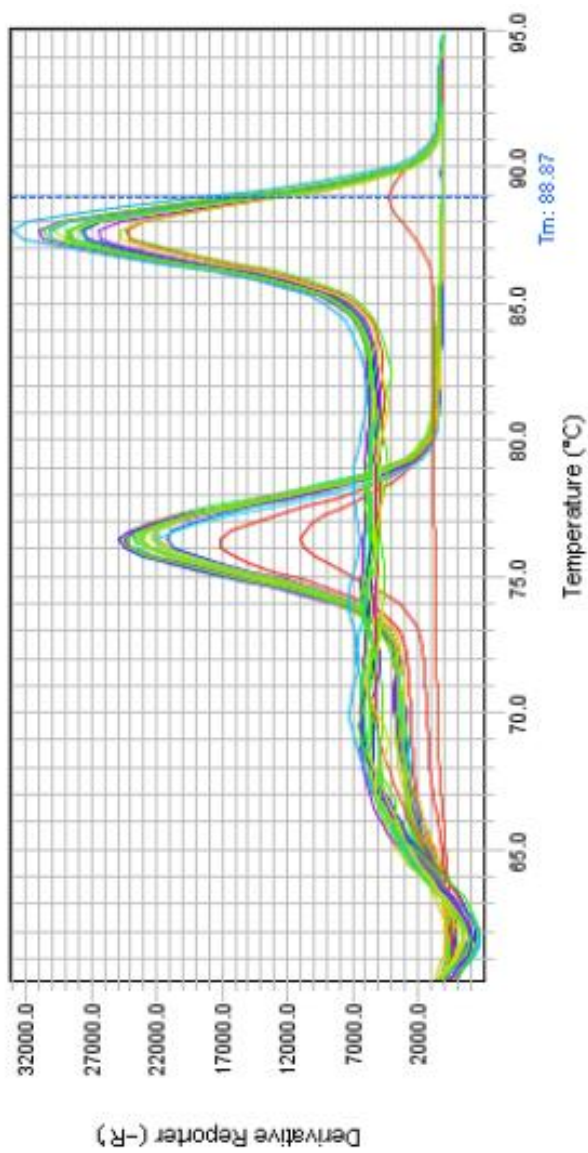


Figura -7 Curvas de disociación del ambos genes (control e interés). El ADN telomérico al ser un fragmento de ADN menor que el de Albumina, se disocia a una temperatura más baja

## **V. *Análisis de LT en los grupos de estudio***

Se obtuvieron las muestras de los ácidos nucleicos de los 3 grupos de pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, donde se les asignó un número de registro y se creó una base de datos con información previamente recabada (Figura 8):

- Grupo 1 → 52 pacientes positivos para la expansión, sintomáticos (EH)
- Grupo 2 → 19 individuos con predictivo positivo asintomático (PP)
- Grupo 3 → 27 individuos con diagnóstico predictivo negativo (PN)

Se prosiguió a la cuantificación de la concentración de ADN para cada una de las muestras mediante el sistema Bio-Drop, obteniendo 3 parámetros: Concentración (ng/ul), relación A260/A230 y relación A260/A280. Con los resultados obtenidos, se realizó una base de datos y se calculó la cantidad de ADN necesaria para obtener una concentración estándar de 7.5ng/ul en 70ul.

<b>Número de muestra</b>	<b>Estatus</b>	<b>Herencia</b>	<b>Sexo</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Fecha toma muestra</b>
--------------------------	----------------	-----------------	-------------	-------------------------	---------------------------

<b>Edad a la toma de muestra</b>	<b>Tiempo de evolución</b>	<b>Alelo normal</b>	<b>Alelo expandido</b>	<b>Tabaquismo</b>
----------------------------------	----------------------------	---------------------	------------------------	-------------------

*Figura -8 Datos recabados de cada individuo para la creación de la base de datos, mismos que serán analizados como variables*

Se realizaron esquemas en Excel (Figura 9) para organizar las muestras de los 3 grupos y asignarlas en la placa MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcod (0.1ml) que se utilizó para la realización del qPCR.

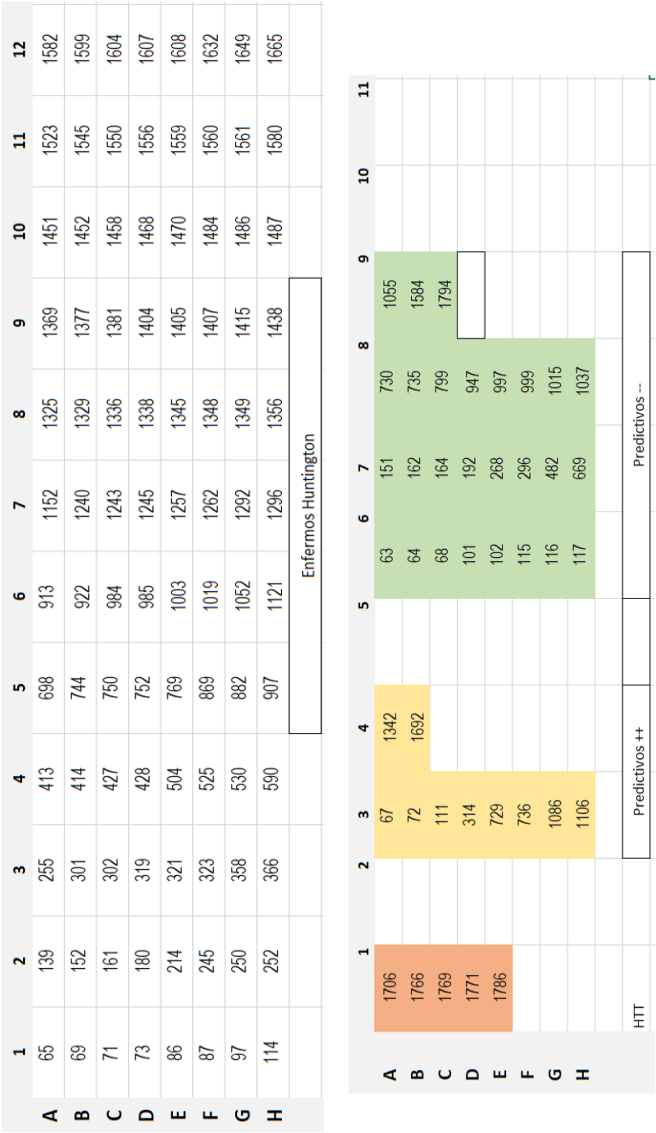


Figura -9

Las reacciones de qPCR de las muestras se realizaron por triplicado en placas de 96 pozos. En cada placa se incluyeron muestras de los tres grupos más el calibrador y controles negativos para controlar la variabilidad interplaca (Figura 10).

El análisis se realizó de la siguiente manera: las muestras con un valor de DE-Ct (desviación estándar de Ct)  $>0.5$  fueron eliminadas del análisis de cada placa, posteriormente se repitieron en placas nuevas. Se exportaron los datos a Excel, donde se obtuvieron valores de Delta ( $\Delta$ ) Ct,  $\Delta\Delta$  Ct y  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ; siendo:

$\Delta Ct$  = proporción Telómero (T) / gen de copia única (albumina: A).

$\Delta Ct$ : Medida indirecta de la longitud telomérica

$\Delta\Delta Ct$  = proporción relativa de T/A

Se utilizaron las siguientes fórmulas para obtener los valores anteriores <sup>1</sup>



- $\Delta Ct = Ct$  de la amplificación del telómero –  $Ct$  de la amplificación del gen de copia simple (albumina).
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (individuo de interés) –  $\Delta Ct$  (calibrador)
- $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  = Longitud relativa del telómero con respecto al gen de referencia en un individuo comparado con el calibrador. Si el  $\Delta\Delta Ct$  es igual a 0 esto representa que no hay cambio entre ambas muestras ( $[2^{(0)} = 1]$ ).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TELOMERO	A	114	114	161	161	161	729	729	729	102	102	102
	B	139	139	180	180	180	736	736	736	115	115	115
	C	152	152	214	214	214	1086	1086	1086	116	116	116
	D	Calibrador	Calibrador	Calibrador	NTC	NTC	1106	1106	1106	117	117	117
ALBUMINA	E	114	114	161	161	161	729	729	729	102	102	102
	F	139	139	180	180	180	736	736	736	115	115	115
	G	152	152	214	214	214	1086	1086	1086	116	116	116
	H	Calibrador	Calibrador	Calibrador	NTC	NTC	1106	1106	1106	117	117	117

Figura -10. Mapa para la colocación de las muestras en las placas de qPCR, cada una por triplicado tanto para telómero como para albumina. Se asignaron en una misma placa muestras de los 3 grupos, la muestra calibrador (también por triplicado) y un control negativo (NTC) triplicado.

## ***VI. Análisis estadístico***

Para la etapa inicial se realizó el análisis estadístico utilizando los valores de  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  de los 3 grupos con el programa “GraphPad Prism”. Se eliminaron los outliers mediante la prueba de ROUT y se demostró una distribución normal de los valores con la prueba D’Agostino & Pearson. Se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA de una vía para comparación de medias en los tres grupos. Se hizo un ajuste de Tukey’s para múltiples pruebas.

Posteriormente se realizó una prueba de ANOVA de dos vías en el programa estadístico SPSS V.19 para determinar el efecto de las potenciales variables confusoras sobre la variable dependiente (longitud relativa del telómero) entre los grupos de estudio. Las variables que se incluyeron en el modelo fueron: sexo y origen parental del alelo mutante.

Además, se realizó un análisis de correlación para determinar si existe relación entre la longitud relativa del telómero y el número de repetidos en el alelo mutado. El

análisis se realizó al interior del grupo EH y del grupo PP mediante la prueba de correlación de Pearson.

En el análisis final no se observó una distribución normal de los valores por lo que se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la que se compararon las medianas entre los 3 grupos.

Posterior a ello se realizó la prueba Mann-Whitney para determinar la diferencia entre pares de grupos. Para conocer el efecto de las covariables (herencia, sexo, tiempo de evolución, alelo mutado) se utilizaron las pruebas de Pearson y Spearman según la naturaleza de cada variable. Y se realizó una regresión logística multivariada para el efecto del alelo mutado y la longitud del telómero.

## Resultados

### ❖ Análisis Preliminar

Se realizó un análisis preliminar para determinar las tendencias de los experimentos. En este análisis se incluyeron un total de 94 muestras: 47 del grupo EH, 19 del grupo PP y 28 del grupo PN.

Se utilizó la prueba de normalidad de D'Agostino para conocer la distribución de los valores de la longitud relativa de los telómeros. En estas muestras se observó una distribución normal por lo que se decidió utilizar pruebas paramétricas para comparación de medias. Se calculó la diferencia entre medias de la longitud relativa de cada grupo utilizando una prueba de ANOVA de una vía y se obtuvo el valor de P (Tabla 4). Se observó que existe una diferencia significativa entre las medias de longitud relativa telomérica de los 3 grupos ( $P < 0.0001$ ). Posteriormente se hizo la comparación entre los posibles pares de grupos. Se obtuvo una P significativa (0.0055) en la comparación de las medias de los grupos EH y PP; y una P significativa ( $< 0.0001$ ) en la comparación del grupo EH con PN. No se encontró diferencia significativa entre los grupos PP y PN.

Tabla 4. Diferencia de la media de la longitud de los telómeros entre los grupos. Valores de P obtenidos de la comparación intergrupos.

GRUPOS	Diferencia de Media	Valor P	
EH vs PP	-0.487	0.0055	**
EH vs PN	-0.693	<b>&lt;0.0001</b>	<b>****</b>
PP vs PN	-0.206	0.4111	Ns

Se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la longitud telomérica del grupo de EH comparada con la de los individuos del grupo PN, encontrándose una menor longitud en el primer grupo (EH). De igual forma entre la longitud telomérica de EH comparada con la del grupo PP. Este análisis muestra que existe una diferencia entre las medias de la longitud telomérica de los 3 grupos. Se observa una tendencia de acortamiento de la longitud telomérica en el grupo PP contra los PN a pesar de no tener una significancia estadística (Figura 11).

Posteriormente se realizó una prueba de ANOVA de dos vías para valorar si el estatus de un individuo podía verse modificado con la presencia de las otras

covariables y por lo tanto si tendrían influencia sobre la longitud relativa del telómero (Tabla 5). Las variables que se incluyeron en este modelo fueron: sexo y origen parental del alelo mutado. Se observó que el efecto de las variables confusoras sobre la variable dependiente no tiene significancia estadística ( $P>0.05$ ) y por lo tanto no influye sobre la diferencia observada en la longitud relativa del telómero.

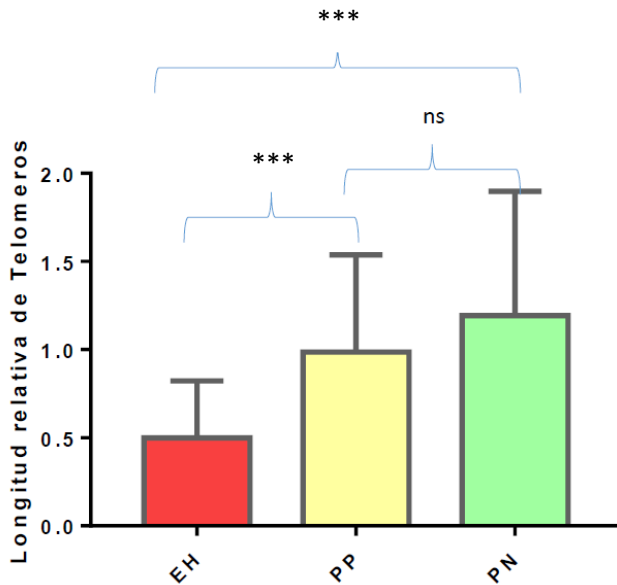


Figura ¡Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento.-11 Comparación de la media de la longitud relativa del telómero entre los 3 grupos, mediante prueba de ANOVA. Las barras indican medias con desviación estándar. EH: Enfermedad de Huntington. PP: Predictivos positivos. PN: Predictivos negativos.

EH vs PN:  $P<0.0001$ , EH vs PP:  $P=0.0055$ . PP vs PN:  $P=0.4111$

*Tabla 5 Efecto de variables independientes sobre la variable dependiente (grupo). Se observa un valor de  $P > 0.05$  en los tres análisis sobre el efecto de las variables. Estas variables no influyen sobre el valor de la longitud relativa del telómero*

Ajuste	Valor de P
Grupo + Sexo	0.86
Grupo + Origen parental	0.84
Grupo + sexo + origen parental	0.08

Se realizó un análisis de correlación en los grupos EH y PP para conocer si había alguna correlación entre la longitud relativa del telómero y el número de repetidos en el alelo mutado. Los datos obtenidos del análisis de correlación al interior de los grupos EH y PP fueron los siguientes:

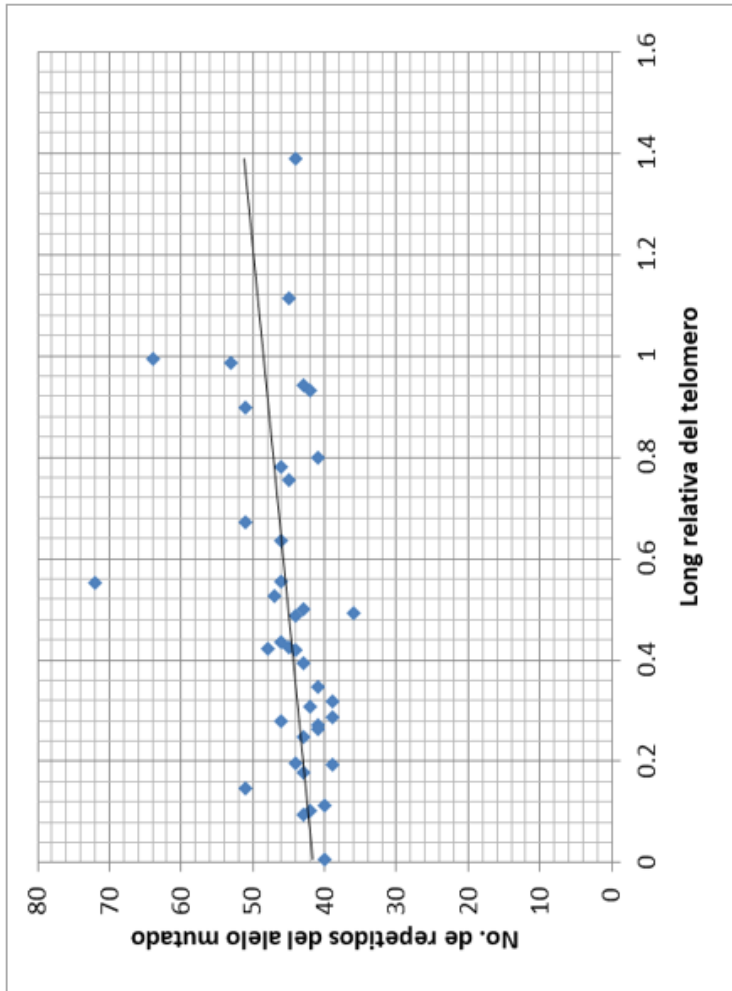
- Coeficiente de correlación de Pearson para el grupo EH: 0.336 ( $P=0.036$ ).

Este resultado muestra que existe una discreta correlación entre el número de repetidos del alelo mutante y la longitud relativa del telómero (Figura 12).



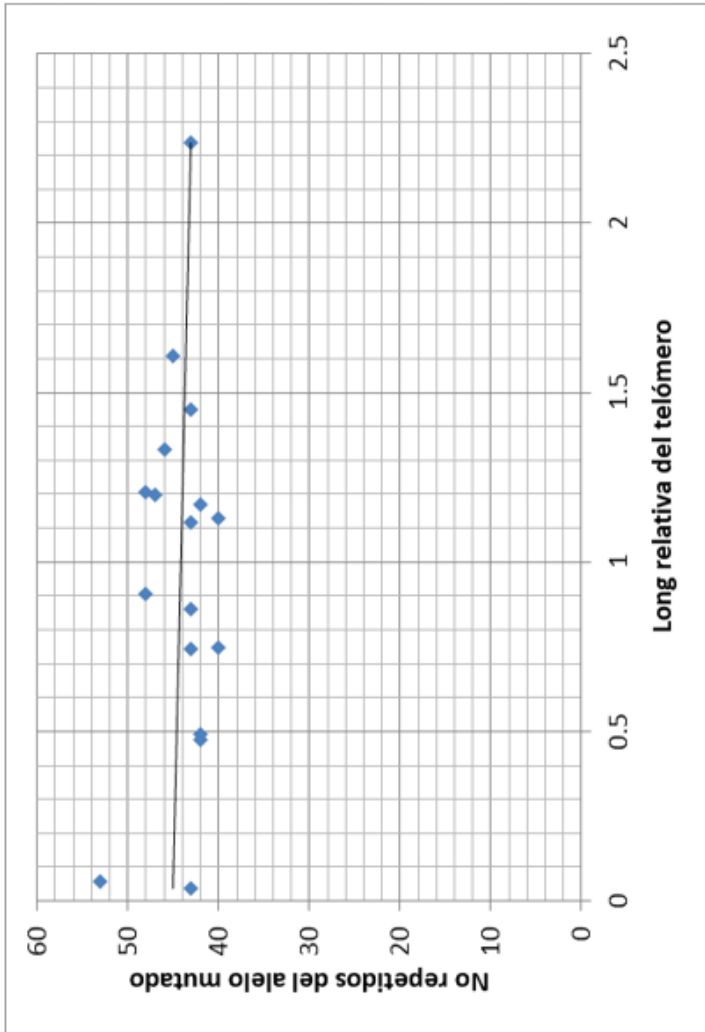
- Coeficiente de correlación de Pearson para el grupo PP:  $-0.149$  ( $P=0.567$ ).

En el grupo PP no existe correlación entre el número de repetidos del alelo mutante y la longitud relativa del telómero para este grupo (Figura 13).



**A**

Figura 12. Grafica de correlación de Pearson. Correlación del número de repetidos del alelo mutado con la longitud relativa del telómero en el grupo de EH. Coeficiente de correlación: 0.336 ( $P=0.036$ ).



**B**

Figura 13. Grafica de correlación de Pearson. Correlación del número de repetidos del alelo mutado con la longitud relativa del telómero en el grupo de PP. Coeficiente de correlación:  $-0.149$  ( $P=0.567$ ).

## ❖ Análisis Final

Para el análisis final se estudiaron un total de 146 muestras: 29 del grupo PP, 47 del grupo PN y 70 del grupo EH. Al analizar la distribución de los valores de la longitud relativa del telómero, se observó que no tenían una distribución normal. Con base en estos resultados se decidió utilizar pruebas no paramétricas. La comparación de la longitud telomérica entre los 3 grupos se hizo mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, obteniendo un valor de P de 0.0127, indicando una diferencia significativa de la longitud relativa telomérica entre los diferentes grupos (Figura 13).

Para identificar entre que grupos se encuentran las diferencias estadísticas se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Tabla 6). Se observó una diferencia estadísticamente significativa de la longitud telomérica del grupo de EH comparado con la del grupo PP ( $P=0.013$ ) y el PN ( $P=0.016$ ). No se observó una diferencia significativa de la longitud relativa de los telómeros entre los grupos PP y PN ( $P=0.814$ ).

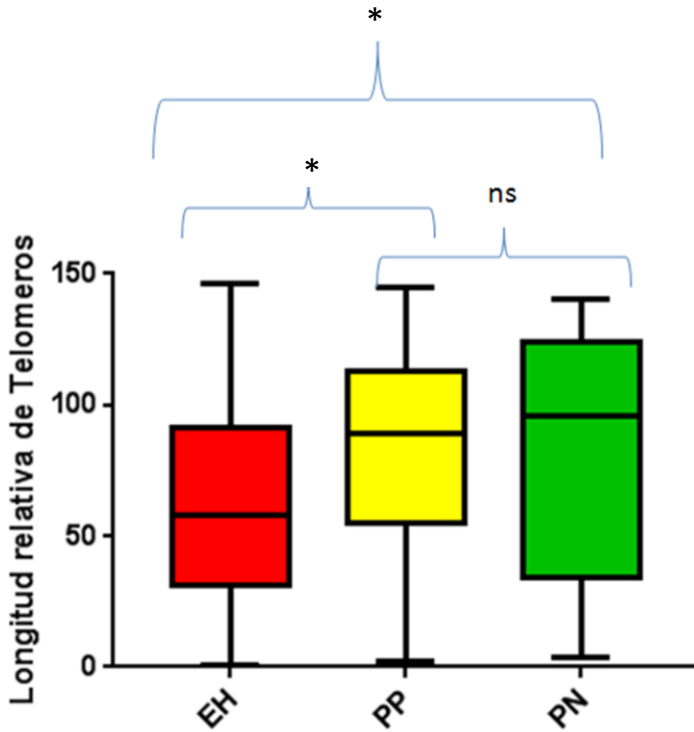


Figura 15 Comparación de longitud relativa de telómeros entre grupos EH, PP, PN. Los bigotes muestran los valores mínimos y máximos. En las cajas se muestra la mediana de la longitud relativa del telómero en cada grupo. En la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo una  $P=0.0127$ . En la prueba de Mann-Whitney se obtuvieron los siguientes valores: EH vs PP:  $P=0.013$ , EH vs PN:  $P=0.016$ , PP vs PN:  $P=0.814$  (no significativo)

*Tabla 6 Comparación de la longitud relativa de telómeros entre los grupos, mediante la prueba de Mann-Whitney. Se muestran los valores de P obtenidos de cada comparación. La comparación de los grupos tanto PP como PN contra EH muestran una diferencia estadísticamente significativa.*

Comparación entre grupos vs		Valor de P
PN	PP	0.814
EH	PN	<b>0.016</b>
EH	PP	<b>0.013</b>

Posteriormente se buscó si existía correlación entre la herencia (materna o paterna) del alelo mutado y el estatus (Tabla 7). Para ello se utilizó la prueba de correlación de Pearson, donde se obtuvo una  $P = 0.08$ . Indicando que no existe correlación.

*Tabla 7 Porcentaje de pacientes del grupo PP cuyo alelo mutado es de herencia materna (79.3%) y el porcentaje que es de herencia paterna (20.7%). Porcentaje de pacientes del grupo EH cuyo alelo mutado es de herencia materna (49%) y de herencia paterna (51%).*

Estatus	Herencia Materna	Herencia Paterna
PP	79.3%	20.7%
EH	49%	51%

También se utilizó la prueba de correlación de Pearson para comprobar si existía correlación entre el sexo y el estatus. Se obtuvo una  $P=0.23$  por lo que no existe correlación.

Se buscó correlacionar la longitud del telómero con el tiempo de evolución de la enfermedad en el grupo EH. Se observó una correlación inversa entre estas dos variables. Se analizó dicha correlación mediante la prueba de Spearman. Se obtuvo un valor de  $P = 0.185$ , no significativa. Por lo que se no consideró que exista correlación.

	Longitud del telómero	Valor P
Tiempo de evolución	-0.1366	0.185

Se realizó una regresión logística multivariada, con la finalidad de estudiar si la longitud del telómero podría predecir el estatus del individuo o la longitud del alelo mutado. Se observó que la longitud del telómero no modifica el estatus del individuo ni tiene efecto sobre el alelo mutado (Tabla 8).

*Tabla 8 Valores de P obtenidos en la regresión logística multivariada ordinal, para el análisis de la longitud del telómero como potencial modificador del estatus y del alelo mutado. No se observó significancia estadística, por lo que no hay relación entre la longitud del telómero como factor de riesgo para modificación del estatus o alelo mutado.*

	Valor de P
Longitud del telómero	
Estatus	0.34
Alelo mutado	0.63

Finalmente se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la comparación entre los 3 grupos de la longitud del alelo mutado. Se encontró una diferencia significativa ( $P = 0.0001$ ) de la longitud del alelo mutado entre los 3 grupos. Para identificar las diferencias estadísticas en los grupos, se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Se obtuvo un valor de  $P=0.888$  en el análisis entre los grupos PP y EH. Las diferencias significativas se encontraron en las comparaciones PN Vs PP ( $P= 0.0000$ ) y PN Vs EH ( $P= 0.0000$ ).



## Discusión

Una de las enfermedades neurodegenerativas progresivas más frecuentes es la enfermedad de Huntington (EH), y generalmente se presenta en la edad adulta. El proceso neurodegenerativo característico de la enfermedad afecta a nivel psiquiátrico, musculoesquelético y cognitivo. Múltiples investigaciones han sido realizadas desde su descripción inicial en 1872 (G. Huntington 1872), pasando por la identificación del locus y la descripción etiológica en 1993 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993), así como la implementación de análisis predictivos para portadores de la mutación (IHA, WFN 1994). En la actualidad la investigación sobre la EH se ha enfocado en 3 áreas principales: identificación marcadores biológicos como predictores de la enfermedad y su evolución, factores modificadores de la enfermedad y posibles tratamientos para EH.

El interés en los marcadores biológicos con relación a la EH se ha basado en el conocimiento que existe sobre la relación entre la presencia de la huntingtina mutada con la mitocondria (Ergün Sahin

2011). Con base en esta relación los estudios se han enfocado en la búsqueda de marcadores de estrés oxidativo, desde niveles enzimáticos, cambios celulares y modificaciones cromosómicas asociadas. En el contexto de las modificaciones cromosómicas asociadas a estrés oxidativo, fue de nuestro interés la relación del acortamiento telomérico como consecuencia del daño al ADN secundario a la presencia de EROs; y su correlación con la EH dentro de la fisiopatología de la neurodegeneración. Estudios previos han demostrado la relación del acortamiento telomérico con envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (P. Thomas et al 2008), y la asociación entre muerte celular prematura y acortamiento telomérico, considerando a este último como marcador de daño celular en las enfermedades neurodegenerativas (Lakshmi Narayanan Kota et al 2015). Se ha demostrado una relación inversa entre la longitud de los telómeros y la progresión de la enfermedad en el caso de Alzheimer (Panossian et al. 2003), comparado con controles sanos.

En un estudio donde se comparó a pacientes con EH contra controles sanos y contra grupos de casos de

pacientes con neurodegeneración sin una expansión de trinucleótidos (demencia, ataxia telangiectasia); se encontró una relación inversa entre la longitud de telómeros y la progresión de la enfermedad (Kota et al 2015).

En este estudio se investigó si existe correlación entre la longitud relativa de los telómeros (TL) en pacientes con EH y la progresión de la enfermedad, el tiempo de evolución con la EH desde el diagnóstico y con el tamaño del repetido de CAG en el gen *HTT* (alelo mutado). Para ello se clasificaron las muestras en 3 grupos según el estatus: EH grupo con diagnóstico clínico de la enfermedad, PP grupo con alelo mutado sin sintomatología y PN grupo con alelo normal.

Los resultados preliminares obtenidos fueron de utilidad para ampliar la muestra y obtener los resultados finales. Al comparar la TL entre los 3 grupos se encontró una diferencia significativa, por lo que se buscó entre cuales de éstos existía la mayor diferencia de TL. Se encontró que la diferencia significativa de la TL se presenta en el grupo de EH comparado con los dos

grupos sanos, sin encontrarse diferencia entre PP y PN. Estos hallazgos sugieren que el estado de enfermo, es decir, el tener sintomatología de la enfermedad es una de las variables que modifica la TL. Una observación que apoya estos hallazgos es que el grupo PP que tiene el alelo mutado, no presenta acortamiento de TL, y ya que la diferencia entre este grupo y el EH es la sintomatología, se concluye que el estado de enfermo es el que modifica la TL y no el número de repetidos de CAG en el alelo mutado. Se buscó si el tiempo de evolución tenía efecto sobre la TL, por lo que se realizó una correlación entre estas dos variables. A pesar de que se observó una correlación inversa, esta no fue significativa, por lo que no se considera que el tiempo de evolución modifique la TL.

Además, se buscó si existía una correlación entre el estatus y las variables de: herencia, sexo y tiempo de evolución, para valorar el comportamiento del estatus ante estas co-variables. No se encontró correlación entre el estatus y la herencia del alelo mutado, esto indica que el recibir el alelo mutado ya sea de herencia materna o paterna no tendrá implicación en el desarrollo de la sintomatología de EH. De igual forma, el sexo no modifica

el estatus de los individuos, esto se comprobó al no observar una correlación entre estas variables. El efecto del alelo mutado con el estatus (como ya ha sido bien establecido en la literatura), se corroboró al no encontrar diferencia de la longitud del alelo mutado entre los grupos PP y EH, y observando una diferencia significativa de la longitud del alelo entre los grupos PP contra PN y, PN contra EH.

De acuerdo a nuestra hipótesis y con base datos obtenidos en nuestro experimento, podemos inferir que existe una correlación indirecta entre la presencia de disfunción mitocondrial y el acortamiento de la longitud relativa de telómeros en las enfermedades neurodegenerativas. Esto crea oportunidades para el desarrollo de probables métodos diagnósticos, de manejo e inclusive, de desarrollo para apoyo terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas, con relación al control de la producción excesiva y el déficit en el desecho de las ERO. Considerando que su presencia descontrolada confiere daño neuronal, a través de envejecimiento y muerte celular temprana por el acortamiento y subsecuente inestabilidad telomérica.

Con esto, podemos sospechar que el uso de estrategias para prevenir el acortamiento telomérico, o aumentar su longitud, podrán prevenir o retrasar la neurodegeneración.

## Referencias Bibliográficas

---

1. Ayala-Peña, y. (2013). Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 102–110.
2. Bates, G. P. (2005). The molecular genetics of Huntington disease -- a history. *NATURE REVIEWS GENETICS*, 766-771.
3. Bhattacharyya., K. B. (2016). The story of George Huntington and his disease. *Ann Indian Acad Neurol.*, 25–28.
4. Cawthon, R. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.*, 37e21.
5. Chao Ting-Kuang, H. J. (2017). Risk Factors for the Onset and Progression of Huntington Disease. *Neurotoxicology*.
6. Damiano, M. &. (2009). Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et biophysica acta.*, 52-61.
7. Duyao, M. e. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature Genet.*, .387–392.
8. Fisher, E. &. (2014). Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. *Mov.Disord.*, 105-114.
9. Fung, K. a. (2014). An update on Huntington's disease. *Curr Opin Neurol*, 477–483.
10. Gusella, J. F. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306, 234-238.
11. Harley CB, F. A. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274):458-60.

- 
12. Heyer WD, F. -E.-L. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet.*2010, 44:113-39.
  13. Huntington, G. (1872). On chorea. *Med. Surg. Reporter*, 320-321.
  14. International Huntington Association and the World Federation of Neurology Research Group on Huntington's Chorea. (1994). Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. *J. Med. Genet*, 555–559.
  15. Jan-Mar, K. B. (2016). *Ann Indian Acad Neurol.*, 25-28.
  16. Jenkins, E. V. (2006). Telomere shortening in T lymphocytes of older individuals with Down syndrome and dementia. *Neurobiol. Aging*, 941–945.
  17. Kota LN, B. S. (2015). Reduced telomere length in neurodegenerative disorders may suggest shared biology. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 92–96.
  18. Kremer, B. G. (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N.Engl.J.Med*, 1401-1406.
  19. Libin Cui, H. J. (2006). Transcriptional Repression of PGC-1 $\alpha$  by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration,. *Cell*, 59-69.
  20. Nasir, J. e. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, 811–823.
  21. Palm W, a. d. (2008). How shelterin protects Mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.*, 301-340.



- 
22. Panossian, L. P. (2003). Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol. Aging*, 77–84.
  23. Perutz, M. F. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 5355–5358.
  24. Ridley, R. M. (1988). Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. *J. Med. Genet.*, 25, 589-595.
  25. Roos, R. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J. Rare Dis.*, 540-1172-5-40.
  26. Rubinsztein, D. C. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30–40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36–39 repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 16–22.
  27. Sahin, E. C. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*, 359–365.
  28. Shirendeb U, R. A. (2011). Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Hum Mol Genet*, 20:1438–1455.
  29. Shirendeb UP, C. M. (2012). Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 406–420.
  30. Sorolla, M. (2008). *Free Radical Biology & Medicine*.

- 
31. Tabrizi, S. J. (2013). Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *The Lancet Neurology*, 637 - 649.
  32. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 971-983.
  33. Von Zglinicki, T. (2000). Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 99–110.
  34. Wei W, F. -S. (1999). Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp Cell Res.*1999 Dec 15, 253(2):519-22.
  35. Wheeler, V. P.-V. (2007). Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. *J.Med.Genet.*, 695-701.
  36. Wong, J. C. (2003). Telomere maintenance and disease. *Lancet*, 983–988.