

**Universidad de la República Oriental del Uruguay**



**Facultad de Química**  
**Departamento BIOCLIN**  
**Cátedra Biología Molecular**



**"DIAGNÓSTICO A NIVEL MOLECULAR Y ESTUDIO  
DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS  
COMO MODIFICADORES DE LA EDAD DE INICIO DE  
LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON"**

**Tesis de Maestría**

**Química Farmacéutica Estela Bidegain**

**Tutora: Dra. Patricia Esperón**

**Montevideo 2014**



## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis hijos Cecilia, Juan Pablo y Leticia, a mis nietos Eva, Antonio, Clara, Paz y Lorenzo a Marti mi compañero, a mis otros hijos Mauricio, Joel y Luciana, para todos ellos de todo corazón y con todo mi amor les agradezco por acompañarme en todo momento, gracias por los tiempos robados, y para darme las fuerzas en todo momento para seguir adelante. Gracias los amo

A mi tutora Patricia, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo, por sus valiosísimas enseñanzas, sugerencias, y por la dedicación especial en esta revisión. Muchas Gracias

A Marcelo, por estar siempre disponible para enseñarme, brindarme todo su apoyo, pacientemente y compartir conmigo todos sus conocimientos. Muchas Gracias

A mis compañeros de cátedra, Cristina. Elizabeth, Cristina, Laura, Fernando, Beatriz, Ana y Mariana, por estar siempre atentos a la progresión en mi tesis, y en esta última etapa especialmente a darme el tiempo necesario para poder finalizarla. Muchas gracias

## **ABREVIATURAS:**

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADORA2A	Adenosine A2a Receptor
APOE	Apolipoproteína E
C	Citosina
CAG	Citosina, Adenina, Guanina
cAMP	Adenosín Monofosfato Cíclico
CBP	Proteína De Unión Al Elemento De Respuesta Del cAMP
CCG	Citosina, Citosina, Guanina
DFFB	DNA fragmentation factor subunit beta
EH	Enfermedad de Huntington
EHIT	Enfermedad de Huntington de inicio tardío
EHJ	Enfermedad de Huntington Juvenil
G	Guanina
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GRIK2	Glutamate Receptor, Ionotropic Kainate 2
GRIN 2A	Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl D-Aspartate 2a
GRIN2B	Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate 2b
HAP1	PROTEÍNA 1 ASOCIADA CON HUNTIGTINA
HIP1	PROTEÍNA INTERACTUANTE CON LA HUNTINGTINA 1
Htt	Huntingtina

LDL	Lipoproteína de baja densidad
M	Metionina
MAP2K6	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6
MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
MSN	Neuronas Espinosas Medias
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase
NRF1,	Factor nuclear respiratorio
PCR	Reacción en cadena de Polimerasa
PPARGC1A	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 A
PPAR- $\gamma$	Peroxisoma Proliferative Activated Receptor
SCA17	Spinocerebellar Ataxia 17
SCA2	Spinocerebellar Ataxia2
SCA3	Spinocerebellar Ataxia 3
SCA6	Spinocerebellar Ataxia 6
SCA7	Spinocerebellar Ataxia 7
SCA1	Spinocerebellar Ataxia 1
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
T	Treonina
T	Timina
TCERG1	Transcription elongation regulator 1
TFAM	Factor A de transcripción mitocondrial.
TP53	Tumor protein p53

UCHL1 Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1

# ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
INDICE	6
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 ENFERMEDAD DE HUNGTINTON	11
1.2 PREVALENCIA	13
1.3 HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE	14
1.4 FENÓMENO DE ANTICIPACIÓN	15
1.5 EXPRESIÓN FENOTÍPICA	16
1.6 EDAD DE INCIO	17
1.7 NEUROPATOLOGÍA	17
1.8 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	22
1.8.1. TRASTORNOS DEL MOVIMIENTO	22
1.8.2. TRASTORNOS COGNITIVOS	24
1.8.3. TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS	25
1.8.4 SINTOMAS EN LA EH DE INICIO JUVEIL	26
2. GENÉTICA MOLECULAR	
2.1.GEN HTT	28
2.1.1. GUIAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	28
2.1.2 MOSAICISMO Y HOMOCIGOCIA.	30
2.2.MUTACION RESPONSABLE DE LA EH	31
2.3. HUNTINGTINA	32
3. GENES MODIFICADORES DE LA EDAD DE INICIO EN	

LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	35
3.1. GENES MODIFICADORES.	36
3.1.2. POLIMORFISMOS EN EL GEN HTT	37
3.1.3. POLIMORFISMO EN EL METABOLISMO PROTEICO	37
3.1.4. POLIMORFISMO EN DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS	39
3.1.4. POLIMORFISMO EN RECEPTORES DE PROT G	40
3.1.5. POLILMORFISMO DEL METABOLISMO ENERGÉTICO	41
3.1.6. POLIMORFISMO DEL TRÁFICO AXONAL	42
4. OBJETIVOS	
4.1. OBJETIVO GENERAL	44
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
5. PACIENTES Y MÉTODOS	
5.1. PACIENTES	46
5.2. DISEÑO DE NUCLEÓTIDOS	46
5.3. METODOS	49
5.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN	49
5.3.2. AMPLIFICACIÓN ADN POR TÉCNICAS DE PCR.	49
5.3.3. ANÁLISIS DE PRODUCTOS DE PCR EN GELES DE POLIACRILAMIDA	51
5.3.4. REVELADO	51
5.3.5. DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR	52
5.3.6. SECUENCIACIÓN	52

6. RESULTADOS	
6.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	54
6.2. RELEVAMIENTO DE DATOS CLÍNICOS DE LAS HISTORIAS	57
6.3. ESTUDIO DE LA EXPANSIÓN DE TRIPLETES CAG	58
6.4 GENEALOGÍAS	
6.4.1. ANÁLISIS DE UNA FAMILIA	60
6.4.2. ANÁLISIS DE OTROS GRUPOS FAMILIARES	62
6.5. ESTUDIO DE LA EDAD DE INCIO DE LOS SÍNTOMAS EN RELACIÓN A LOS REPETIDOS CAG	65
6.6 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES MODIFICADORES	68
7. DISCUSIÓN	70
7.1 POLIMORFISMOS	74
8. CONCLUSIONES	78
8.1 PERSPECTIVAS	79
9. BIBLIOGRAFÍA	80

## RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH), es un trastorno neurodegenerativo progresivo del sistema nervioso central, que afecta específicamente a algunas estructuras cerebrales. Es una patología genética de herencia autosómica dominante de penetrancia completa. Causada por una expansión de tripletes CAG, en el exón 1 del gen HTT que codifica la proteína Huntingtina. Es de expresividad variable con una edad de inicio en la década de los 40 años, y existe una fuerte correlación inversa entre la cantidad de repetidos CAG y la edad de inicio de los síntomas. Factores genéticos y factores ambientales influyen en esta variabilidad. En este trabajo se puso a punto el diagnóstico de Huntington, inexistente anteriormente en nuestro país, y se relacionó la variación en la edad de comienzo de los síntomas tanto con la cantidad de repetidos CAG, como con polimorfismos presentes en genes modificadores. Los polimorfismos estudiados fueron: la expansión CCG y  $\Delta 2642$  en gen HTT, ApoE, UCHL1 (rs5030732), ADORA2A (rs5751876), PPARGC 1a (rs7665116), HAP 1 (rs4523977).

Por tratarse de una enfermedad muy poco frecuente, las correlaciones que involucren estudios estadísticos no han sido posibles. Sólo se pueden

hacer deducciones caso a caso que permiten una más profunda comprensión de esta patología.

El estudio en conjunto de los polimorfismos en los genes modificadores y las expansiones CAG, permitió entender mejor las bases genéticas de esta patología, aportándonos mayor información acerca de la variabilidad en la edad de aparición de los síntomas.

## **INTRODUCCION**

### **1.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

La enfermedad de Huntington (EH), es un trastorno neurodegenerativo progresivo del sistema nervioso central, que afecta específicamente a estructuras cerebrales como la corteza cerebral y el cuerpo estriado (caudado y putamen), donde las neuronas van degenerando y posteriormente mueren.

Se le llamó así porque fue descrita por el médico americano George Huntington (1850-1916) que la descubrió en 1872, y escribió "Esta enfermedad tiene tres marcadas peculiaridades: su carácter hereditario, una tendencia a la locura y al suicidio, se manifiesta como una enfermedad grave solamente en la edad adulta", también conocida como Corea (en griego significa danza) y durante mucho tiempo se le llamó también " El mal o baile de San Vito ".

De etiología genética, presenta un patrón de herencia autosómico dominante con expresividad variable y penetrancia completa, es decir, los individuos que heredan el alelo mutado, eventualmente desarrollarán la enfermedad, a menos que mueran de otras causas antes del inicio de los síntomas.

Diferentes estudios han demostrado una marcada variación en la edad de inicio de los síntomas, debido a los diferentes criterios aplicados para su determinación. Muchas veces los médicos no presencian las primeras señales y síntomas de la EH, la mayoría de las veces la valoración de los primeros cambios son observados por el paciente o su familia.

Provoca trastornos en el control motor y emocional, la capacidad cognitiva, y un característico movimiento coreico. La distonía es

prominente en los estadios avanzados de la enfermedad. Generalmente la bradiquinesia coexiste con la corea y, en los casos juveniles, se puede observar un estado parkinsoniano con un significativo enlentecimiento de los movimientos oculares, y en algunos de estos casos, temblores y mioclonus.<sup>1</sup>

La pérdida del control sobre los movimientos voluntarios contribuye de manera importante a la incapacidad física en los pacientes con EH. Esto progresa a lo largo del curso de la enfermedad hasta que provoca una incapacidad total para ejecutar cualquier movimiento que el individuo se haya propuesto realizar. Además, en los estadios intermedios de la enfermedad es común la disfunción de la deglución y el habla, lo que conduce a una incapacidad para engullir y para comunicarse.

Los trastornos psiquiátricos asociados a la EH tienen diversas presentaciones que incluyen psicosis con alucinaciones visuales (raramente), depresión, trastornos afectivos, manías, comportamiento obsesivo y agresivo, apatía, desinhibición sexual y abuso del alcohol. Todos los pacientes manifiestan trastornos cognitivos, con un más rápido declive del desempeño visuoespacial en comparación con el verbal. También se observan trastornos de la memoria, la atención y la concentración desde los estadios iniciales de la enfermedad.<sup>2</sup>

Su forma de presentación más característica es a través de la tríada de síntomas, movimientos involuntarios, trastornos psiquiátricos y deterioro de las funciones cognitivas, estos conducen a la muerte 15 a 20 años después del inicio de los síntomas.

Pertenece a un grupo de enfermedades cuya etiopatogenia es la expansión genética de tripletes CAG situadas en regiones codificantes. El triplete CAG codifica el aminoácido glutamina, por lo que estas patologías

son las llamadas enfermedades poliglutamínicas entre las que se encuentran la EH y las ataxias SCA1; SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, entre otras.

Estas proteínas glutamínicas tienen una expresión ubicua, sin embargo son tóxicas solamente para poblaciones neuronales específicas. Estudios recientes han contribuido a esclarecer los mecanismos moleculares que subyacen estos procesos patológicos, aunque no se cuenta aún con terapias curativas, en ninguno de los casos.<sup>3</sup>

## **1.2 PREVALENCIA**

Se encuentra en todos los grupos étnicos y la prevalencia está estimada entre 5 y 10 afectados por cada 100.000 habitantes entre poblaciones de Europa Occidental y descendientes de estas poblaciones (poblaciones caucásicas). Sin embargo hay pequeñas áreas de prevalencia alta y baja. Estas diferencias en la frecuencia se relacionan con los orígenes étnicos de estas poblaciones particulares. Por ejemplo en África la prevalencia es baja ( $<0.01/100.000$ ), han sido reportadas tasas bajas también en Japón ( $0.11 - 0.45/100.000$ ).<sup>4</sup>

El grupo de mayor prevalencia se encuentra en la región de Zulia (Noroeste de Venezuela, junto al lago Maracaibo), donde aproximadamente el 40% de la población está en riesgo, al menos hay 1000 personas mostrando síntomas y otros 3000 presintomáticos.<sup>5</sup> Esa frecuencia en la población en dicha región está entre  $1/143 - 1/23.000$ ,<sup>6</sup> mientras que si se toma en cuenta el resto de Venezuela es de  $1/200.000$ .<sup>7</sup> El defecto génico fue introducido por un individuo en una comunidad aislada, y se propagó como resultado de la relación entre personas

afectadas en esta área aislada. Lo mismo ocurre en la isla de Tasmania (Sur de Australia) donde la prevalencia es de 12/100.000.

Estudios realizados de prevalencia en América del Sur muestran diferentes realidades, en Venezuela, con una alta prevalencia en la región de Zulia, en donde se da la más alta prevalencia mundial. Para la provincia de Cañete Perú es de 31/100.000<sup>8</sup> en un estudio reciente en Argentina se encontró que la prevalencia es similar a la Europea <sup>9</sup>; en Brasil un estudio realizado en la ciudad de Feria Grande se encontró 1/1375 <sup>10</sup> habitantes, pero no hay estudios de prevalencia a nivel de población total de Brasil.

Las distintas frecuencias están relacionadas con el origen étnico de cada población en particular, y el origen de la EH en cada región. La mayoría de los estudios genealógicos han demostrado que la migración del noroeste de Europa fue el factor principal responsable para la propagación de la EH por el mundo. En general se observa una baja prevalencia de la enfermedad en poblaciones de origen no europeo como consecuencia de que el efecto genético se ha introducido más recientemente.

### **1.3 HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE**

El término autosómico dominante describe a uno de los patrones de herencia clásicos o mendelianos y se caracteriza por presentar el fenómeno de dominancia genética para un determinado alelo de un gen cuyo locus se encuentra ubicado en alguno de los autosomas o cromosomas no determinantes del sexo.

Por este mecanismo una determinada característica heredable se transmite en una forma que puede ser predicha sin tener en consideración el sexo del descendiente. Además para que esta

característica heredable se exprese basta con que el descendiente reciba el gen de uno solo de sus progenitores.

Si una enfermedad es autosómica dominante, significa que a un individuo le alcanza con recibir el alelo anormal de uno de los padres para heredar la enfermedad. Por lo tanto, lo más frecuente es que al menos uno de los padres presente la enfermedad. En estos casos el alelo del progenitor transmisor puede ser un alelo anormal, ya expandido, puede ser un alelo premutado entre 27 a 35 repetidos, o alelo mutado con penetrancia reducida de 36 a 39 repetidos CAG.

Es muy poco frecuente encontrar enfermos homocigotos (dos alelos mutados), pues esto exigiría la unión de dos heterocigotos. Sin embargo, hay algunas enfermedades autosómicas dominantes en la que esto sucede con mayor frecuencia de lo habitual, debido a que tienen una frecuencia génica más alta porque ellas no son letales, sino de comienzo tardío, por lo que permiten llegar a la edad fértil, sin conocer su condición de portador, y tener descendencia propagando la mutación; este es el caso de la Enfermedad de Huntington.

#### **1.4 FENOMENO DE ANTICIPACIÓN**

Las mutaciones por expansión de segmentos de trinucleótidos se denominan dinámicas o inestables ya que tienden a aumentar de generación en generación. Como existe una relación inversa entre el tamaño de la expansión de un segmento de poliglutamina y la edad de aparición de los síntomas, en tales enfermedades puede producirse el fenómeno de "anticipación", donde los descendientes presentan los síntomas a una edad anterior a la del progenitor afectado.

Aunque la inestabilidad meiótica de la repetición en EH, se produce tanto en transmisión materna como paterna, hay un aumento mayor de repetidos en la espermatogénesis que en la oovogénesis. Cuando el progenitor afectado es la madre, es frecuente que la expansión sea pequeña de uno a tres repetidos, se mantenga, o incluso se han observado contracciones de los repetidos

### **1.5 EXPRESION FENOTIPICA**

Penetrancia es la probabilidad de que un gen tenga alguna expresión fenotípica. Se entiende que cuando esta probabilidad es del 100% hablamos de penetrancia completa y cuando es menor del 100 % es incompleta o reducida. En la EH todos los individuos que hereden el alelo mutado eventualmente desarrollarán la enfermedad, a menos que mueran de otras causas antes del inicio de los síntomas.

La expresividad de una mutación se puede definir como el grado de expresión del fenotipo causado por la mutación. Cuando un fenotipo es distinto en individuos que tienen el mismo genotipo, se dice que el fenotipo tiene una expresividad variable.

En la EH, la expresividad es variable y los índices de gravedad están basados en medidas motora y cognitivas, sin embargo se estudia que los cambios de comportamiento muchos años antes de comenzar con los síntomas característicos de la enfermedad son un alerta, y aún más cuando estos vienen acompañados con depresión, irritabilidad, y apatía o desmotivación.<sup>11</sup>

Existe una correlación inversa entre el número de repetidos CAG, y la edad a la que se desarrolla la enfermedad, siendo más precoz el inicio de los síntomas cuanto más larga es la secuencia repetida. La mayoría de los

pacientes adultos, tienen alrededor de 38 a 50 repetidos, y aquellos que tienen 60 o más repeticiones padecen EH juvenil, pudiendo aparecer los primeros síntomas en la adolescencia o en la niñez.

## **1.6 EDAD DE INICIO**

Si se tiene en cuenta el concepto clásico de que una enfermedad se inicia cuando aparecen los síntomas y signos, diversos estudios han establecido que la edad de inicio media de la EH se sitúa alrededor de los 40 años, aunque se ha descrito tanto en niños como en personas de edad avanzada.

La variabilidad en la edad de inicio de los síntomas clínicos permite diferenciar tres formas, formas de inicio precoz, siempre antes de los 20 años, tanto en la infancia (1 %) o en la juventud (10 %), formas de inicio tardío (50 años o 60 años según diferentes autores) y forma de inicio en la edad adulta.<sup>12</sup>

## **1.7 NEUROPATOLOGÍA**

La degeneración sucede principalmente en células de ganglios basales, en especial en el núcleo caudado y en el globo pálido alterando funciones motoras; también afecta la corteza cerebral la cual controla el pensamiento, la percepción y la memoria. Así pues, la degeneración más importante tiene lugar en el estriado, lo que conduce a la corea y en segundo lugar, en el córtex cerebral, lo que es causante de la demencia.

El estriado se localiza en el cerebro anterior y pertenece al sistema motor subcortical de los ganglios basales, que manda señales a la corteza cerebral a través del tálamo. Este sistema está formado por el estriado, el

núcleo subtalámico, el globo pálido y la sustancia negra, además de participar fundamentalmente en el control del movimiento.

Estudios anatomopatológicos demuestran que las alteraciones fisiopatológicas de la EH son casi específicas del cerebro. Las principales alteraciones encontradas son atrofia cerebral, pérdida neuronal selectiva, gliosis y agregados proteicos intraneuronales. La neuropatología asociada a esta enfermedad afecta al núcleo estriado, principalmente a las capas profundas de la corteza cerebral, al hipocampo, a la sustancia negra, al cerebelo, al hipotálamo y al tálamo, lo que origina una disminución del volumen del cerebro y un aumento del volumen de los ventrículos cerebrales. En la EH todas las neuronas se ven afectadas, las primeras son las medianas espinosas y entre ellas las responsables de los movimientos coreiformes, que conectan con el globo pálido externo. La gliosis que se produce en la EH es una respuesta al daño neuronal, y el grado de esta se asocia con la pérdida neuronal.<sup>13</sup>

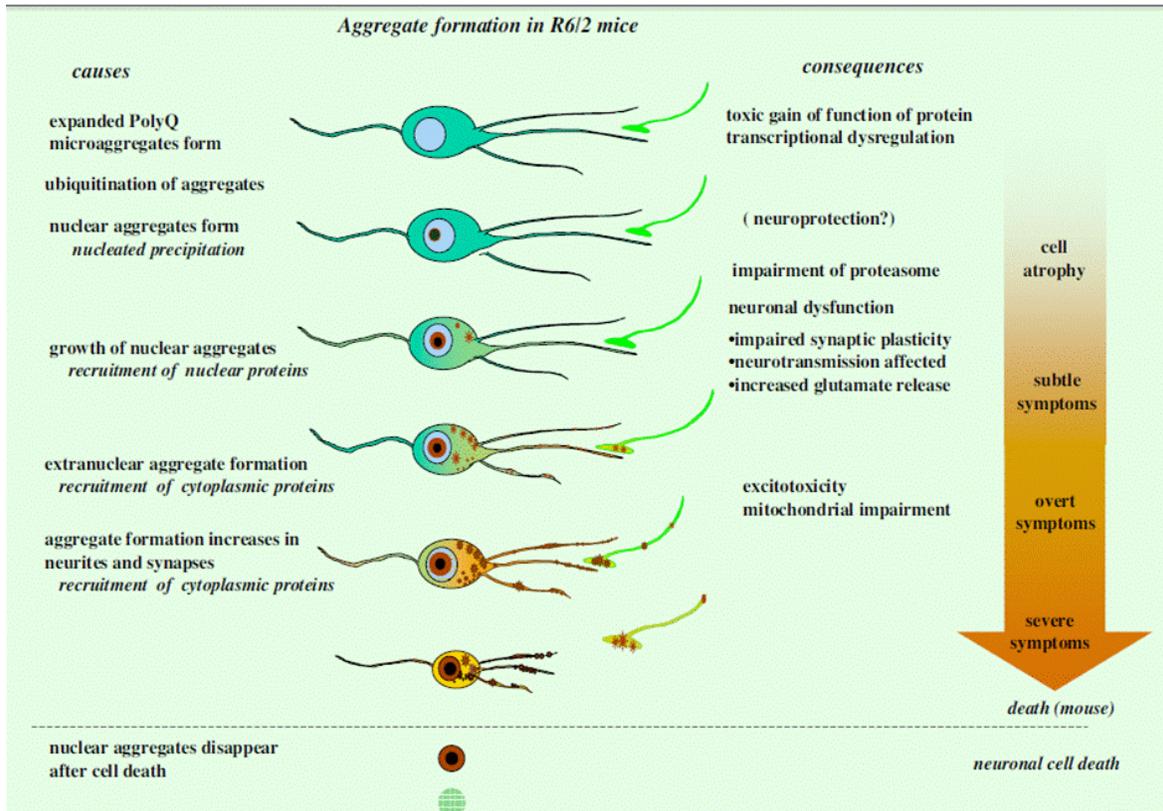


Fig 1: Esquema de muerte neuronal, en ratones. (Morton J, Molecular Pathogenesis of Huntington's Disease.)

Se demostró en ratones (Fig 1) que los agregados proteicos aparecen primero en los núcleos de neuronas, y a continuación en los axones, dendritas y sinapsis. Su aparición se correlaciona con el inicio de los síntomas. Sin embargo el cambio progresivo que se vio simplemente sugería un cambio de roles de la proteína como si la proteína mutada fuera beneficiosa para la célula o benigna, simplemente porque se eliminaría esa célula del medio. Pero a su vez estas inclusiones reclutan elementos esenciales celulares del tipo de proteínas de choque térmico, componentes del proteosoma y sinucleína, por lo que la presencia de estos agregados sería perjudicial para la función celular. Además, la presencia de estos agregados de proteína mutada en axones, dendritas o sinapsis podría perjudicar funciones esenciales de estas estructuras. En

ratones estos agregados fueron encontrados en todas las neuronas. Pero en análisis post-mortem de cerebro con EH, se encontraron esparcidos en neuronas estriatales, pero eran predominantes en neuronas corticales. Si bien no está claro el porque de esta distribución se postula que puede ser que cuando las neuronas del cuerpo estriado degeneran, los agregados desaparecen <sup>14</sup>

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad (movimientos anormales, alteraciones del comportamiento y deterioro cognitivo), pueden explicarse por la lesión del estriado o por la modificación que esta lesión causa en los circuitos cortico-subcorticales que conectan los ganglios basales con el lóbulo frontal y con regiones motora suplementaria, oculomotora, orbitofrontal, dorsolateral y cortes límbicos. Los dos primeros circuitos están relacionados con el control motor, mientras que los otros circuitos se asocian con las funciones cognitivas y comportamentales. Más específicamente la conexión entre la región frontal dorsolateral y el caudado parece tener implicación en las funciones ejecutivas y otros déficits neurosicológicos, mientras que lesiones en las conexiones del caudado con regiones orbitofrontales y límbica originan alteraciones del comportamiento como memoria, desinhibición e irritabilidad. <sup>15</sup>

Las neuronas más afectadas son las neuronas espinosas de tamaño medio (MSN), que constituyen el 95 % de las neuronas del estriado. Las MSN utilizan GABA como neurotransmisor y proyectan al globo pálido y a la sustancia negra. Localizados en la matriz del estriado sus cuerpos celulares reciben un gran número de señales, como las glutaminérgicas de la corteza y del tálamo, colinérgicas de las interneuronas colindantes, gabaérgicas de MSN y adyacentes y dopaminérgicas que proceden de la

sustancia negra. Las señales dopaminérgicas modulan la transmisión desde la corteza cerebral al estriado.

Las MSN, además de GABA, tienen otros neurotransmisores. Basándose en los neurotransmisores que contienen y el tipo de receptores de dopamina que expresa, se pueden dividir en dos poblaciones: una que contiene dinorfina (Dyn) y sustancia P, y expresa receptores D1 y otra que cuenta con encefalina (Enk) y expresa receptores D2. Aquellas neuronas que expresan receptor D2 o que contienen encefalina degeneran primero, mientras que las que expresan receptores D1 o contienen sustancia P demoran más en degenerar.

La degeneración de las MSN, ocurre de acuerdo a un gradiente de la parte ventral posterior a la medio lateral y se asocia con una menor expresión de la sustancia P, leu-encefalina, calcineurina, receptores H2 de histamina, receptores dopaminérgicos, y receptores de adenosina A2. Hay una modificación característica de las neuronas espinosa, la retracción axonal antes de la muerte celular (Fig 2) <sup>16 17</sup>

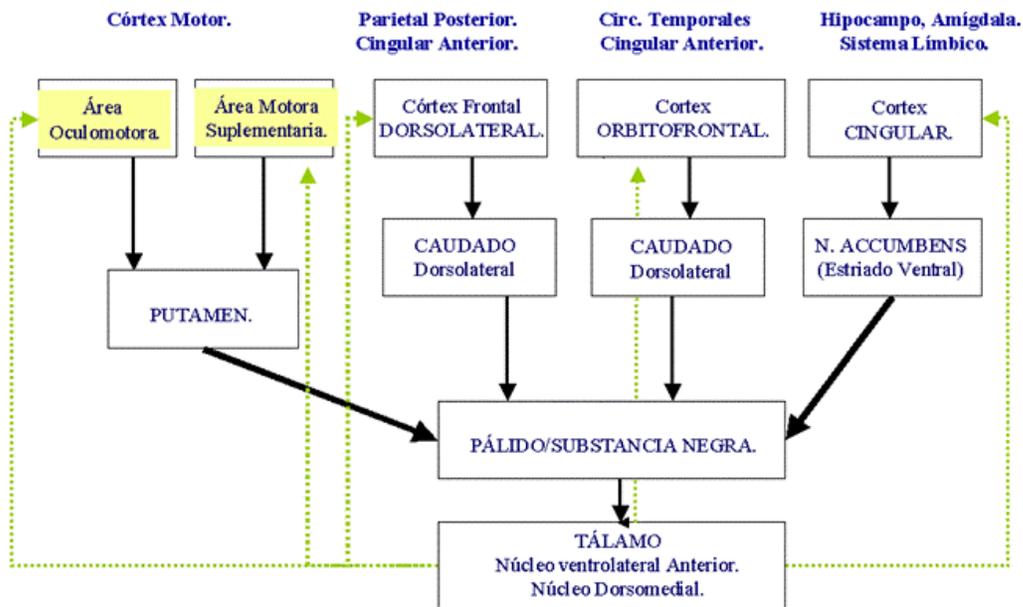


Fig 2: Esquema circuitos afectados en cerebro en Enfermedad de Huntington (Barquero M. S, Gómez E, "Cognitive Disorders in Huntington's Disease Patients." First International Congress on Neuropsychology in internet" Servicio de Neurología. Unidad de Memoria. \*Hospital Clínico San Carlos. \*\*Fundación Jimenez Díaz Madrid.1999)

## 1.8 MANIFESTACIONES CLINICAS

La evolución clínica de la EH es gradual. Los pacientes pasan por una fase inicial que precede a los síntomas evidenciables de la enfermedad, comprendida entre la fase presintomática normal hasta el momento en que se puede hacer el diagnóstico clínico con un examen neurológico o con la aparición de síntomas característicos de la patología.

### 1.8.1. TRASTORNOS DEL MOVIMIENTO

Los trastornos del movimiento asociados con la EH pueden incluir tanto los movimientos involuntarios como alteraciones en los movimientos voluntarios.

El síntoma más característico de esta enfermedad es el movimiento coreico. La corea se define como un síndrome hiperkinético caracterizado

por movimientos involuntarios, amplios, irregulares, generalizados y bruscos que no pueden suprimirse voluntariamente por el individuo.

La distonía caracterizada por la lentitud de los movimientos y posturas anormales no aparece con frecuencia en los primeros estadios de la enfermedad.

La bradiquinesia es un trastorno motor resultado de una rigidez muscular, se manifiesta por los movimientos lentos de los dedos y la pérdida de los movimientos finos como los de la escritura, son síntomas relacionados con el inicio de la enfermedad.<sup>18</sup>

Las distonía es un trastorno del movimiento en la que contracciones musculares sostenidas causan torceduras y movimientos repetitivos involuntarios que se traducen en posturas anormales.

Las alteraciones de la motilidad ocular se encuentra entre los síntomas que aparecen primero y afecta a la mayoría de los pacientes, especialmente en los que la enfermedad se desencadena a temprana edad, al igual que la hiperreflexia, que es una respuesta exacerbada de los reflejos, mientras que el clonus, que consiste en la aparición involuntaria de contracciones musculares repetitivas y rítmicas al estirarse ciertos grupos musculares, aparece más tarde en el desarrollo de la enfermedad.

19

La marcha se va haciendo más dificultosa a medida que avanzan los síntomas, al igual que la postura y el equilibrio como consecuencia de esto los pacientes sufren severas caídas y es frecuente que terminen confinados a una silla de ruedas.<sup>20</sup>

La dificultad con la producción física de la palabra, se observa también al comienzo de la enfermedad, mientras que la disfagia o dificultad para tragar comienza con la ingesta de líquidos, y con el progreso de la

enfermedad también dificulta los sólidos, siendo responsable de los eventos respiratorios potencialmente letales de la aspiración o asfixia.<sup>21</sup>

Las alteraciones en los movimientos voluntarios, en lugar de los movimientos involuntarios, pueden tener un mayor impacto en la capacidad de una persona para trabajar, realizar las actividades diarias, comunicarse y permanecer independiente.<sup>22, 23</sup>

### **1.8.2. TRASTORNOS COGNITIVOS**

Las alteraciones neuropsicológicas que suelen aparecer en la EH se encuadran dentro de lo que se conocía en su momento como demencia subcortical. Actualmente, se utiliza este mismo concepto para nombrar una serie de enfermedades que cursan con un conjunto de cambios neuropatológicos, cognitivos y afectivos similares. Las principales estructuras cerebrales que suelen alterarse en la demencia subcortical son los ganglios basales y el tálamo, mientras que las estructuras corticales suelen preservarse.

En la actualidad, gracias a los grandes avances que se han podido realizar en el campo de las neuroimágenes y la neuropatología, se sabe que la corteza frontal presenta una gran cantidad de conexiones con diferentes estructuras, como son los ganglios basales, el tálamo, la amígdala, el córtex entorrinal y el hipocampo, y que las lesiones a lo largo de estas conexiones o circuitos serían las responsables de muchas de las alteraciones cognitivas (córtex prefrontal dorsolateral) y emocionales (córtex orbitofrontal y cíngulo anterior) que suelen observarse en varias enfermedades neurodegenerativas. En el plano cognitivo, suelen presentarse trastornos de atención, memoria, capacidad de abstracción, lenguaje y habilidades visuoespaciales.

Las deficiencias cognitivas, a menudo asociados con la enfermedad de Huntington, son dificultad para planificar, organizar y priorizar las tareas, incapacidad para iniciar una tarea o una conversación, falta de flexibilidad o tendencia a quedarse en un pensamiento, conducta o acción, falta de control del impulso que puede dar lugar a los arrebatos, actuar sin pensar y promiscuidad sexual. Problemas con la percepción espacial que pueden resultar en caídas, torpeza o accidentes, y falta de conciencia de las propias conductas y habilidades con dificultad para concentrarse en una tarea durante largos períodos.

Diferentes investigadores han observado que los pacientes con EH presentan trastornos en los procesos de aprendizaje y memoria. Algunos han afirmado que dichos trastornos pueden aparecer en etapas preclínicas de la enfermedad, varios años antes de la aparición de los movimientos coreicos. Otros investigadores sostienen que la capacidad de registrar, almacenar y consolidar la información suele preservarse en personas con EH, y que su déficit principal es la utilización de estrategias inadecuadas de recuperación de la información. Esto puede ser la causa de que muchos de estos pacientes presenten un rendimiento en las pruebas de memoria explícita, mientras que su rendimiento suele mejorar ostensiblemente en las tareas de reconocimiento. Sin embargo, estudios recientes plantean que los sujetos con EH, no sólo presentan trastornos en la recuperación de la información, sino que, además, suelen tener afectado, igualmente, el reconocimiento, tanto en la modalidad visual como en la verbal.<sup>22, 23</sup>

### **1.8.3 TRASTORNOS PSIQUIATRICOS**

El trastorno psiquiátrico más común asociado con la enfermedad de Huntington es la depresión. No parece ser simplemente una reacción al

recibir un diagnóstico de la enfermedad sino que parece ocurrir debido a una lesión en el cerebro y los cambios posteriores en la función cerebral. En muchos casos la depresión es el primer síntoma y pasa desapercibida hasta que aparecen nuevos síntomas más específicos de la enfermedad.

Los signos y síntomas pueden incluir sentimientos de tristeza e infelicidad, aislamiento social, insomnio o sueño excesivo, fatiga cansancio y pérdida de energía, pensamientos frecuentes de muerte o suicidio y cambios en el apetito. Otros trastornos pueden ser el trastorno obsesivo-compulsivo, que se caracteriza por pensamientos intrusivos y conductas repetitivas, manías que pueden causar hiperactividad, comportamiento impulsivo y ánimo elevado, y también se pueden ver trastorno bipolar, o alternantes de depresión y manía.

Otros cambios en el estado de ánimo o la personalidad, pero no necesariamente los trastornos psiquiátricos específicos, pueden incluir, irritabilidad, apatía, y ansiedad.<sup>24</sup>

#### **1.8.4 SINTOMAS EN LA EH DE INICIO JUVENIL**

Aproximadamente el 10 % de todos los pacientes con EH manifiestan los primeros síntomas de la enfermedad antes de los 20 años de edad, los síntomas son algo diferentes en el inicio y en la progresión de la patología, y depende de la cantidad de repetidos CAG.

Músculos contraídos y rígidos que afectan la marcha, bradiquinesia, es uno de los primeros síntomas en la EH juvenil, cambios en las habilidades motoras finas, como dificultad en la escritura a mano, pérdida de habilidades académicas o físicas previamente aprendidas, un menor rendimiento escolar, con problemas de conducta, temblores o movimientos involuntarios bruscos, convulsiones.

Por el contrario de la EH en la edad adulta, los movimientos coreicos, si bien está presente son de corta duración y sustituidos frecuentemente por la rigidez.<sup>25</sup>

## 2. GENETICA MOLECULAR

### 2.1 GEN HTT

El gen causante de esta patología, HTT, se encuentra en una región telomérica del cromosoma 4 (4p16.3), (Fig 3) tiene 67 exones y codifica una proteína de 350 KD aproximadamente, huntingtina. Diez años después de su descubrimiento, en 1993, fue identificada la mutación que consistió en la expansión de una secuencia repetitiva de CAG situada en el primer exón del gen HTT.<sup>26</sup>

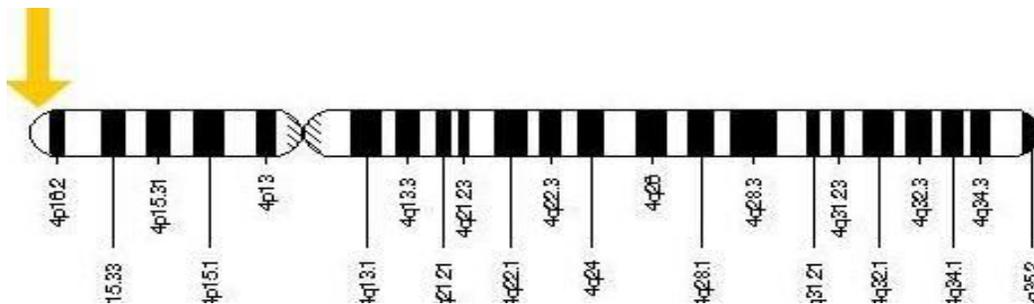


Fig 3 Cromosoma 4. Ubicación del gen HTT (4p16.3)  
<http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/HTT.jpeg>

#### 2.1.1 Guías para el diagnóstico de la EH

El Colegio Americano de Genética Médica, y su departamento de Aseguramiento de la Calidad a través del Subcomité Molecular y el Grupo de trabajo para la EH con el fin de unificar el diagnóstico de esta patología publicó en el año 2004, las siguientes guías de como definir los tamaños de los alelos.(Fig 4)

Alelos normales: están definidos como aquellos alelos que tienen una secuencia CAG <26 repetidos. Estos alelos no son patológicos y segregan de forma estable en un 99 % durante la meiosis. Para la población normal el tamaño del alelo más común se encuentra entre 17 a 19 repetidos.

Alelos mutables: se definen como aquellos que tiene entre 27 y 35 repetidos CAG, esta cantidad de repeticiones llamadas "alelos intermedios" frecuentemente se encuentran en el rango de inestabilidad meiótica. Estos alelos aún no han sido asociados con un fenotipo patológico; pero pueden ser meióticamente inestables sobretodo en esperma, no han sido reportadas transmisiones maternas en que la madre tuviera esta cantidad de repetidos. Aproximadamente 1.5% a 2 % de la población general posee alelos en este rango. La probabilidad de la transmisión en este rango de expansión a un alelo más ampliado depende de varios factores, incluyendo el sexo, el tamaño del alelo expandido, la configuración de la región circundante de los repetidos CAG, y su haplotipo. El riesgo de recibir un alelo expandido con un padre que posee 35repetidos CAG se ha calculado en un 6 % a 10 %

Alelos con penetrancia reducida: definidos como alelos con 36 a 39 repeticiones CAG. Son meioticamente inestables, asociados en forma documentada con fenotipo clínico y neuropatológico de EH. Sin embargo en algunos casos se han encontrado en personas ancianas asintomáticas, aunque el número limitado de este tipo de casos no ha posibilitado el estudio más amplio de los mismos.

Alelos con penetrancia completa: se definen como aquellos alelos con más de 40 CAG. A pesar de que hay numerosos reportes en que personas ancianas poseen alelos de 40 y 41 repetidos, permaneciendo asintomáticos, no hay reportes de personas que no hayan tenido ningún síntoma con este tipo de alelos. Los alelos con mayores expansiones >60 repetidos CAG se relacionan con EH juvenil.<sup>27</sup>

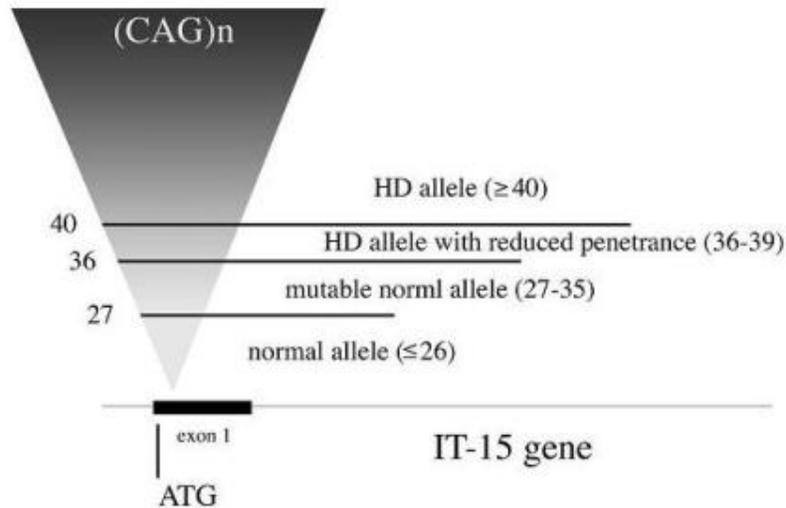


Fig 4 Guías y Técnicas Standard para el análisis de la Enfermedad de Huntington. Potter N, Spector E, Prior T. Escribir este pie de figura

### 2.1.2. MOSAICISMO Y HOMOCIGOCIA

El mosaicismo se ha relacionado tanto con inestabilidad meiótica como mitótica, en el cerebro y el esperma, asociado a pronunciadas expansiones solamente en casos de EH juvenil, pero el grado en que aparece no es significativo como para comprometer la interpretación de la extensión de los repetidos CAG, con ADN extraído de linfocitos de sangre periférica.<sup>27</sup>

La homocigosis en EH es rara, ha sido estudiada en una población venezolana donde se encuentra la mayor prevalencia de la enfermedad, ya que el 40 % de la población se encuentra afectada. En una familia de 14 hermanos se encontró que cuatro de ellos eran homocigotos. En estos casos no se encontraron características clínicas que pudieran distinguir a estas personas de aquellos que padecen la enfermedad con un genotipo heterocigoto.<sup>28, 29</sup>

## 2.2 MUTACION RESPONSABLE DE LA EH

La EH se debe a una mutación dinámica, en una región inestable del genoma, en este caso un triplete CAG, en el exón 1 del gen HTT. El producto del gen mutado es una proteína (huntingtina) con residuos poliglutamínicos adicionales, que son causantes de agregados intranucleares en neuronas específicas.

Aunque la tasa de nuevas mutaciones en EH es baja, mutaciones de novo, estas se pueden originar a partir de alelos intermedios de 27 - 35 repeticiones, principalmente a través de transmisión paterna.<sup>30</sup>

Si bien se ha avanzado en el conocimiento que se tiene de las mutaciones dinámicas y la inestabilidad de los alelos, el mecanismo por el cual ocurre la expansión de repetidos, aún no se comprende en su totalidad. Se presume que la estructura secundaria del ADN cumple un rol importante en este proceso y la expansión puede surgir por errores en la replicación, reparación por mal apareamiento de hebras, mismatches, y /o recombinación. En las secuencias con tripletes repetidos encontramos elementos de simetría que le permiten mayor flexibilidad a la doble hélice, pudiendo formar estructuras alternativas. En los intentos de amplificar ADN de pacientes con patologías ocasionadas por repetición y extensión de tripletes se encontró que se forman estructuras secundarias en los procesos de desnaturalización y renaturalización, que se producen tanto in vitro como in vivo, como son transcripción, recombinación reparación y replicación. Si bien aún no se ha podido demostrar la existencia de estas estructuras en mamíferos, se ha logrado en sistemas de levaduras, lo que nos permite una aproximación y afirmar la existencia de un equilibrio dinámico de las distintas estructuras alternativas de los tripletes repetidos.<sup>31</sup>

A pesar de haber sido encontrada una correlación inversa estadísticamente muy significativa entre el número de repeticiones de CAG y la edad de inicio y progresión de la enfermedad, existe una gran variabilidad en la edad de inicio independiente de la longitud del tracto de CAG, que sugiere la existencia de otros genes modificadores con mayor efecto en individuos con pequeño número de repeticiones de CAG.<sup>32</sup>

## **2.3 HUNTINGTINA**

El gen HTT codifica la proteína huntingtina, htt, con función aún desconocida, pero que posiblemente está implicada en el desarrollo embrionario normal, en la hematopoyesis y en la neurogénesis. La huntingtina presenta normalmente hasta 35 residuos de glutamina en el extremo N-terminal, mientras que la forma mutante muestra 38 o más residuos y forma agregados cuya translocación hacia el núcleo parece ser un hecho crítico que induce la muerte neuronal por apoptosis.<sup>33</sup>

Se ha puesto mucho esfuerzo en la comprensión de los mecanismos patogénicos de la proteína la mayoría impulsados por la hipótesis de ganancia de función de la proteína mutante. Una característica notable, compartida por la huntingtina mutante y otras proteínas implicadas en otras enfermedades de repetidos CAG es su tendencia a formar agregados insolubles que se acumulan en los núcleos neuronales.

El papel que desempeña la proteína de tipo silvestre aún no está bien entendido. A pesar de su gran tamaño, ha sido difícil establecer la función normal de la huntingtina debido a que contiene muy poca homología con otras proteínas; se sabe que se expresa constitutivamente y que se localiza en todos los compartimientos subcelulares, donde se asocia con organelos como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias. Estudios posteriores han comprobado la relación de la

huntingtina silvestre con su función antiapoptótica, interrumpiendo la cascada, cuando inhibe el pasaje de la procaspasa-9 a la forma activa caspasa 9.<sup>34</sup>

El exceso de poliglutamina al parecer induce cambios conformacionales en la huntingtina de individuos afectados, formando agregados intracelulares, que en la mayoría de los casos se manifiestan como inclusiones intranucleares. Múltiples investigaciones han sido llevadas a cabo para determinar la función y efecto patológico de la poliglutamina; todas concluyen que su papel es complejo y que opera en muchos niveles celulares. Estudios recientes demuestran que la degeneración neuronal en la enfermedad resulta de un efecto combinado de ganancia de función en la forma mutada de la huntingtina, con pérdida de función del tipo silvestre.<sup>35</sup>

Otros estudios han demostrado que la proteína mutada interfiere con el metabolismo energético mediante la represión transcripcional de PGC-1a, (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 a) que es un coactivador transcripcional que regula varios procesos metabólicos incluyendo biogénesis mitocondrial y fosforilación oxidativa; y que el PGC-1a juega un papel importante en la homeóstasis de la energía en el cerebro, y representa un blanco a estudio entre la proteína mutada y la EH.<sup>36</sup>

Se afirma además, que la proteína mutada puede estar implicada en la regulación de transcripción de genes ya sea por los agregados intranucleares, o por el secuestro de importantes factores de la transcripción, como CBP (proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP), proteína de unión a TATA. Así se refuerza la hipótesis de un papel de la desregulación transcripcional en EH, por este motivo es que se asocia la presencia de la Huntingtina mutante con una transcripción

reducida de varios genes importantes. Además una forma soluble de esta proteína puede interferir con componentes específicos de la maquinaria transcripcional en etapas tempranas de la EH.<sup>34</sup>

Se dan además interacciones anormales proteína-proteína con la forma mutada de la Huntingtina; el aumento de la asociación con la HAP1, que participa en el tráfico intracelular, y la endocitosis de membrana celular,<sup>37</sup> y decrece su interacción con HIP1, proteína que tendría una función endocítica y regulando la apoptosis.<sup>38</sup>

La asociación de proteínas de la reparación por mal apareamiento de bases, a las estructuras alternativas de ADN generadas por la amplificación de repetidos, podría estar en la base de la inestabilidad, explicando el fenómeno de amplificación.

### **3. GENES MODIFICADORES DE LA EDAD DE INICIO EN ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

La mayoría de los pacientes inicia los síntomas en la cuarta década de la vida aunque en un reducido número de pacientes se presenta antes de los 20 (EH juvenil), o después de los 50 años de edad (EH de inicio tardío). Aquellos que presentan un gran número de repeticiones de 60 o más, son casos en que la enfermedad puede aparecer en la infancia o adolescencia, HD juvenil.<sup>39</sup>

Hay estudios realizados con pacientes con 75 y 90 años con expansiones CAG en el rango de tamaño de 36 a 39 repetidos (rango mutable), y nos sugieren que los portadores de expansiones pequeñas pueden sobrevivir sin síntomas en la vejez.<sup>40</sup>

La expansión de tripletes CAG en el ADN ha sido identificado como la mayor causa de la enfermedad de Huntington, y determina el 42 al 73% de la variación en la edad de inicio de la enfermedad, y el restante está influenciado por factores genéticos y ambientales.<sup>41</sup>

La mejor estrategia para la identificación de genes modificadores es el desarrollo de una pesquisa global del genoma. Si bien tiene la ventaja de no hacer asunciones apriori acerca de los procesos biológicos subyacentes al fenómeno en estudio, es dificultosa por el gran número de individuos necesarios para el desarrollo de investigaciones y sobre todo por su elevado costo.

En este caso la estrategia utilizada para encontrar los genes candidatos en particular estos polimorfismos a ser estudiados, fue realizar una extensa búsqueda bibliográfica en la base de datos de (National Center for Biotechnology Information) NCBI.

### 3.1 GENES MODIFICADORES

Los genes modificadores pueden ser definidos como aquellos que aceleran o debilitan la manifestación fenotípica de otros genes, a través de formas transitorias de interacción. Pueden o no tener una manifestación propia, pero varían indefectiblemente el efecto de otros genes no alélicos.

Luego de encontrar el gen responsable de la codificación de la proteína huntingtina, se comenzó la búsqueda de genes codificadores de proteínas que estuvieran implicados en la patología de la EH, relacionados con exitotoxicidad, toxicidad de la dopamina, deterioro metabólico, desregulación de la transcripción, proteínas de mal plegamiento y el estrés oxidativo. Los primeros polimorfismos encontrados en el mismo gen, responsable de la enfermedad fueron un segmento rico en CCG, en dirección 3' a continuación de la secuencia de repetidos CAG, y la delección de un ácido glutámico,  $\Delta 2642$ , en el exón 58 que se presentan tanto en el gen afectado de la huntingtina como junto con el gen silvestre.<sup>42</sup>

La estrategia para identificar otros genes candidatos modificadores de la edad de inicio en la EH, fue enfocarse en aquellos genes que conectaban las vías o los procesos metabólicos que participan en la patogenia de la enfermedad, y aquellos SNPs o regiones del gen HTT que pudieran aparecer relacionados con la patología.

Si bien aún no está totalmente claro, se postula que los genes modificadores con más posibilidades de estar implicados en la EH, parecen implicar la transmisión glutaminérgica, (GRIK2, GRIK 2A, GRIN2B), proteína de degradación (UCHL1), los vinculados con la transcripción de genes (TCERG1, TP53), el estrés o respuesta a apoptosis (DFFB, MAP3K5, MAP2K6), metabolismo de lipoproteína (APOE), tráfico axonal (HAP1),

metabolismo del folato (MTHFR), y metabolismo energético (PPARGC1A), receptores de proteína G (ADORA2A).<sup>43</sup>

### **3.1.1 POLIMORFISMOS EN EL GEN HTT**

#### Repetidos CCG

En el mismo exón 1 del gen HTT, gen de la huntingtina, y a continuación de la secuencia de repetidos CAG en dirección 3', existe una secuencia de tripletes CCG, que varía en número de repetidos al igual que el triplete CAG. El alelo wild type de esta secuencia es de siete repetidos y es el que se ha encontrado asociado con mayor frecuencia con los alelos expandidos de la secuencia CAG. Si bien ha sido ampliamente estudiado por la posible influencia en la edad de inicio de la EH, aún no hay suficiente evidencia que apoye esta teoría.<sup>44</sup>

#### Δ2642

Otro polimorfismo ubicado en el gen HTT en el exón 58, es la delección del codón 2642, que codifica para ácido glutámico, y la presencia de esta delección se ha relacionado ampliamente desde el principio con la disminución de edad de inicio en la EH. Aunque estudios posteriores no pudieron confirmar estos hallazgos.<sup>45, 46</sup>

### **3.1.2 POLIMORFISMO EN METABOLISMO LIPOPROTEICO**

#### ApoE

Durante su vida y en mayor medida con la edad, las neuronas deben ser remodeladas y reparadas para mantener las conexiones sinaptodendríticas; la apoE participa en estos procesos. Desempeña un rol central en el transporte de colesterol, reflejado por la asociación de la

apoE a una variedad de lipoproteínas pertenecientes a distintas clases según su peso molecular, por su habilidad para interactuar con dos receptores hepáticos diferentes (receptores LDL y apoE), y por su síntesis en varios tejidos del organismo principalmente en el hígado y en el cerebro. Hasta la fecha han sido identificados 3 alelos comunes de la apoE que codifican para las isoformas E2, E3 y E4.

E3 es la isoforma más común en la población y contiene una cisteína en la posición 112 y una arginina en la posición 158, ApoE2 la de menor frecuencia en la población contiene cisteína en las dos posiciones y ApoE4 contiene arginina en las dos posiciones. Estas isoformas difieren una de la otra solo por un aminoácido sustituido en las posiciones 112 y 158, sin embargo tienen consecuencias fisiológicas profundas.

Las isoformas E2 y E3 son más efectivas que la E4 en el mantenimiento y reparación normal de las células, los efectos fisiopatológicos del alelo E4 en la neurodegeneración puede implicar la reducción de la neuroprotección contra la agregación del  $\beta$ -amiloide, y contra las especies reactivas de oxígeno. Aunque en contraste se estudian hallazgos de que el alelo E4 retrasaría la edad de inicio de pacientes con EH, el genotipo E2E3, E3E3 se relacionan con una edad más temprana de aparición de los síntomas.<sup>47</sup> Otros estudios realizados para buscar una posible relación con la expansión de tripletes CAG, y la edad de comienzo de los síntomas, no han podido llegar a las mismas conclusiones; no se encontraron variación en la edad de inicio de los síntomas tanto motores como psiquiátricos.<sup>48</sup>

### 3.1.3 POLIMORFISMO EN DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS.

#### UCHL1

Se ha demostrado que la expresión de la huntingtina mutada causa excitotoxicidad y daño mitocondrial con el aumento de radicales libres de oxígeno, con alteraciones de la producción de energía, alteración del transporte a lo largo de los axones, deterioro de la endocitosis y el transporte de las vesículas intracelulares, y aunque está controvertido también se ha propuesto que la huntingtina puede poner en peligro el sistema ubiquitina proteosoma.<sup>49</sup>

El gen UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1) codifica a la ubiquitina hidrolasa carboxi terminal que es una pequeña proteína de 76aa que actúa como marcador de degradación para un amplio espectro de proteínas celulares, ubicada en los cuerpos de Lewys de las neuronas, se liga a proteínas para ser digeridas. La unión de ubiquitina a los sustratos es muy específica y se produce a través de una serie de pasos enzimáticos. Su papel en el sistema proteolítico sugiere una manifestación estructural de respuesta de protección celular, para eliminar o secuestrar elementos celulares dañados. Regula los receptores de los neurotransmisores, proteínas quinasa, proteínas sinápticas y factores de transcripción. El funcionamiento de la ubiquitina en las neuronas no es homogéneo y está sujeta a regulación de los diferentes compartimentos neuronales.<sup>50</sup>

Variantes génicas del gen UCHL1 han sido descritas, aquellas que llevan ganancia de función y las que resultan en una pérdida de función. Podemos encontrar dos mutaciones, la 193M que resulta con una actividad menor casi del 50 % y la S18Y (rs5030732) que muestra un aumento de su actividad hidrolítica con respecto a la proteína wild-type,

pero con una reducción de su actividad ligasa. Este polimorfismo además tiene la capacidad específica de actuar como un potente antioxidante en sistemas de cultivos neuronales.

El mecanismo del efecto protector del polimorfismo S18Y no está aún bien dilucidado pero se puede explicar parcialmente por su actividad incrementada como antioxidante demostrado en células neuronales que expresan el mismo.<sup>51</sup>

En un estudio realizado en 138 pacientes con EH y en 136 sujetos controles, fueron examinados los polimorfismos I93M y S18Y del gen UCHL1; la mutación I93M no fue identificada; no obstante, el polimorfismo S18Y estuvo presente en el 17% de los pacientes. A este polimorfismo le fue atribuido el 13% de la varianza residual en la edad de inicio. Además, el S18Y fue encontrado en tres de los cuatro pacientes con edades de inicio anormalmente tardías, confirmándose su efecto modificador sobre la edad de inicio.<sup>52</sup>

### **3.1.4 POLIMORFISMO EN RECEPTORES DE PROTEÍNA G.**

#### **ADORA2A**

Este gen ADORA2A (Receptor de adenosina A2A) codifica un miembro de la superfamilia de receptores de proteína G, que se subdivide en clases y subtipos, es un miembro de proteína de unión de nucleótidos de guanina. Estos receptores son proteínas transmembrana, que responden a las señales extracelulares y activan las vías de transducción intracelulares. Es un subtipo de receptor de adenosina A2A; agonista endógeno de la adenosina, e interactúa con la familia de proteínas G aumentando los niveles de cAMP intracelulares. Desempeña un papel importante en muchas funciones biológicas, tales como el ritmo cardíaco y la circulación,

el flujo sanguíneo cerebral y renal, la función inmune, la regulación del dolor y el sueño. Se ha implicado en condiciones fisiopatológicas tales como enfermedades inflamatorias y trastornos neurodegenerativos.<sup>53</sup>

Los receptores de adenosina codificados en el exón 3 del gen ADORA2A tienen un cambio sinónimo de C361T, (rs5751876),<sup>54</sup> son ampliamente expresados en el cuerpo estriado, y juegan un papel facilitador en la liberación de diferentes neurotransmisores, y regulan mecanismo de excitotoxicidad. Se ha demostrado in vitro que aquellas células que presentan los receptores ADORA2A T361T, responden con un incremento importante de cAMP en presencia de la huntingtina mutada cuando las mismas son estimuladas. A pesar de esto el rol que cumple este receptor en la EH aún no está aclarado. Un posible papel del mismo en la etiopatogenia de la enfermedad es que este receptor puede contribuir a la muerte celular en isquemia asociada a neurodegeneración.<sup>55</sup> Estudios que han evaluado la asociación de este polimorfismo con la edad de inicio de los síntomas en la EH han encontrado de que el genotipo T/T mostraba una anticipación de unos 3,8 años frente al genotipo C/C.<sup>56</sup>

### **3.1.5 POLIMORFISMO DEL METABOLISMO ENERGÉTICO.**

#### PPARGC-1a

La proteína codificada por el gen PPARG (Peroxisoma Proliferative Activated Receptor), llamada PPARGC-1A es un coactivador transcripcional que regula los genes que participan en el metabolismo energético, además de regular la biogénesis y función mitocondrial. La proteína interactúa con el receptor nuclear PPAR- $\gamma$  que permite la interacción con múltiples factores de transcripción. Puede interactuar y regular las actividades de respuesta a cAMP, y al factor nuclear respiratorio. Es un

enlace directo con los estímulos fisiológicos externos y la regulación de la biogénesis mitocondrial. También está vinculada en el control de la presión arterial, la homeóstasis del colesterol celular y el desarrollo de la obesidad.<sup>57</sup>

Existe actualmente evidencia experimental que implica al gen PPARG en enfermedades neurodegenerativas tales como EH, Alzheimer, y Parkinson.

Además de mejorar la biogénesis mitocondrial, este gen también está relacionado con la protección contra las especies reactivas de oxígeno mediante la inducción de enzimas desintoxicantes. Por lo tanto cuando hay una defectuosa expresión o función de PGC-1a, la desregulación transcripcional y la neurodegeneración se ven favorecidas.<sup>58</sup>

La huntingtina mutante disminuye la expresión del gen PGC-1a y sus genes diana. El polimorfismo ubicado en la región 3' del intrón 2 del gen cuyo cambio es una timina por una citosina, (rs7665116). En varios estudios de población Europea ha sido relacionado con un adelanto en la edad de inicio de los síntomas en la EH, por su relación con el NRF1, factor nuclear respiratorio, y con TFAM, factor A de transcripción mitocondrial.<sup>59</sup>

### **3.1.5 POLIMORFISMO DEL TRÁFICO AXONAL**

#### HAP1

Esta proteína llamada la proteína 1 asociada con huntingtina (HAP1) fue la primera proteína que se pudo relacionar interactuando con la huntingtina. Se une más estrechamente con la variante mutada, que la de tipo salvaje. Se expresa predominantemente en el centro del sistema nervioso, particularmente en el prosencéfalo basal, corteza cerebral, cerebelo, bulbo olfativo, hipotálamo y núcleo supraóptico, y se localiza al igual que

la Htt en el citoplasma. Su asociación con organelos específicos como mitocondrias, microtúbulos o vesículas sinápticas, es casi idéntico que el de la Htt.<sup>60</sup>

A través de su relación con proteínas en los microtúbulos está relacionada con el tráfico axonal, por lo que se vincula estrechamente con la endocitosis. Por ejemplo Htt y Hap1 son co-transportadoras bidireccionalmente de proteínas en los axones.

Se han identificado varios polimorfismos en el exón 2 de HAP1, y el cambio de aminoácido en la posición M441T es el cambio de una guanina por una adenina, (rs4523977), ha sido el más estudiado en la EH como posible modificador de la edad de inicio de los síntomas. Se ha observado que el M441 reduce el número de neuronas degeneradas con respecto al T441, lo que sugiere un efecto protector del polimorfismo M441, aunque no se ha podido comprobar que estos polimorfismos por si solos den lugar a una mayor degeneración neuronal en la patología.<sup>61</sup>

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el tamaño exacto del número de repetidos CAG en los pacientes afectados por EH, mediante el uso de técnicas de Biología Molecular.

Analizar cómo la presencia de otros polimorfismos puede afectar la edad de comienzo de la enfermedad.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

4.2.1 Implementar el diagnóstico molecular de la EH

4.2.2 Relevamiento de datos clínicos de las historias

4.2.3 Construir genealogía de las familias consultantes.

4.2.4 Estudiar la expansión de tripletes CAG, y la inestabilidad de la repetición en las distintas generaciones, establecer si hay diferencias entre los sexos que transmiten la expansión.

4.2.5. Estudiar la edad de inicio de los síntomas en relación a los repetidos CAG

4.2.6. Estudiar el genotipo de los genes modificadores, expansión CCG en gen HTT y  $\Delta$  2642, ApoE, UCHL1 (rs5030732), ADORA2A (rs5751876), PPARGC 1a (rs7665116), HAP 1 (rs4523977).

4.2.7 Realizar la asociación entre la presencia/ausencia del polimorfismo con la edad de inicio de la enfermedad

## **5. PACIENTES Y MÉTODOS**

### **5.1. PACIENTES**

Se estudiaron en total 23 pacientes, con consentimiento informado, los mismos fueron derivados para el diagnóstico de la Clínica de Parkinson y Movimientos Anormales, Instituto de Neurología (Hospital de Clínicas, Universitario), y de otros centros de salud privados. Diecisiete de ellos ya tenían un diagnóstico clínico de la enfermedad de Huntington, realizado por neurólogo y genetista, de acuerdo a su sintomatología, edad de inicio de los síntomas y edad del paciente, dos pacientes se encontraban asintomáticos, pero se consideraba en riesgo por ser familiar de primera línea de un afectado, y cuatro de ellos en los que no se encontró la mutación.

### **5.2. DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS**

Se diseñaron los distintos juegos de oligonucleótidos según las secuencias genómicas correspondientes, que se encuentran publicadas en diferentes bases de datos entre ellas (Ensembl Genome Browser, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Los oligonucleotidos fueron diseñados con el programa Gene Runner , y con <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> primer BLAST.

Juego de Oligonucleotidos para amplificar la secuencia CAG en el gen IT 15

HD1 5' ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC 3'

HD2 5' GGCGGCGGTGGCGGCTGTTG 3'

HD3 5' CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT 3'

Juego de Oligonucleotidos para amplificar la secuencia CCG en el gen IT 15

HD1 5' ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC 3'

HD2 5' GGCGGCGGTGGCGGCTGTTG 3'

HD3 5' CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT 3'

Juego de Oligonucleotidos para amplificar la deleción 2642 en el gen IT 15

FV2 5' CAGTGCCCCGTTTCTGTGG 3'

RV1 5' ACAATTTTTCTTTTTCCGGTAG 3'

Juego de Oligonucleotidos para APOE

FV 5' TTCTGTCTCACCTCCAG 3'

RV 5' TTTATTCTGAGCACCGGG 3'

Juego de Oligonucleotidos para HAP 1

HAP 1 Forsec 5' AGTGAACGAGGCGGGTATAG 3'

HAP 1 Rev\_sec 5' TTCCTACGTCTGTGCCTGTG 3'

HAP 1 Forwt 5' GAGATCATCCTCCTTAGAGAAG 3'

HAP1 Formut 5' GAGATCATCCTCCTTAGAGAAA 3'

Juego de Oligonucleotidos para UCHL1

UCHLFor-sec 5' GCTTGTGCTGTGTCATTGC 3'

UCHLRev 5' GGCTCCTCCCTTCCTTGTAG 3'

UCHLForwt 5' TCCTCTCCGCAGCTGCTGCC 3'

UCHLFormut 5' TCCTCTCCGCAGGTGCTGCA 3'

Juego de Oligonucleotidos para ADORA2A

ADORForsec 5' AGTGACCGAGAGCAGGTCAG 3'

ADORRevsec 5' TGGCACTCTCTCTTTCTCC 3'

ADORForwt 5' AGCGGAGGCCCAATGGC TTC

ADORFormut 5' AGCGGAGGCCCAATGGCTCT 3'

Juego de Oligonucleotidos para PPARGC1A

GC1AFor\_sec 5' CTGCTGTTGACATGATGTTCTG 3'

GC1AFwt 5' TTATGCTGGGACAATGCACT 3'

GC1AFmut 5' TTATGCTGGGACAATGCATC 3'

GC1ARev 5' CAAGACTCAACACAGGTTATGC 3'

## 5.3.MÉTODOS

### 5.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN genómico se obtuvo de leucocitos a partir de 3 mL de sangre periférica usando un Kit de extracción comercial. Se basa en la lisis celular con detergente, lavado para eliminación de proteínas y posterior precipitación con etanol. Se estima cantidad de ADN obtenido en geles de agarosa revelado con BrEt, método utilizado también para verificar la calidad del ADN.

### 5.3.2 AMPLIFICACIÓN DE ADN POR LA TÉCNICA DE PCR

Se utilizaron diferentes condiciones de PCR para realizar las reacciones, variando las temperaturas de hibridación según el caso:

El ciclado se realiza de la siguiente forma: 3 min - 95°C – desnaturalización

35 ciclos que consisten en 30 seg – 95°C- desnaturalización

1 min – TM – annealing

30 seg – 72°C – extensión

Finalmente se realiza 1 ciclo de extensión a 72 °C durante 5 min

#### Condiciones de reacción

Solucion madre	Conc de Reactivos para solución de trabajo para una reacción
Buffer PCR 10 X	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8 mM (para repetidos CAG) o 1.5 mM para los demás sistemas

dNTPs (40 mM)	0.8 mM
Primer F (100 mM)	1mM
Primer R (100 mM)	1mM
Taq Polimerasa 100 U	2 U
Agua	Cantidad suficiente para 20 $\mu$ L

### Temperaturas de ciclado

Reacción	TM °C
Gen IT 15	65
$\Delta$ 2642	56
APOE	56
HAP 1	58
UCHL1	56
ADORA2A	56
PPARGC1A	60

### **5.3.3 ANÁLISIS DE PRODUCTOS DE PCR EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

Los productos amplificados para determinar el número de repetidos CAG fueron resueltos en gel de poliacrilamida al 8%, migrado durante 2 horas a 80 V y revelados con nitrato de plata.

Los demás sistemas se analizaron en geles de poliacrilamida al 6 %.

Composición del gel de corrida: Acrilamida 29,2%, Bisacrilamida 0,8%, 0,8 % Persulfato de amonio (10% de agua), y 0,08% TEMED.

### **5.3.4 REVELADO**

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se coloca en una solución fijadora (sol 1) durante 5 minutos, luego se tiñe durante 8 minutos en la solución de nitrato de plata (sol 2), se lava con agua destilada el menor tiempo posible (10 seg) y se coloca finalmente en la solución reveladora (sol3), hasta la aparición de las bandas. El posterior secado de gel se realiza colocando el mismo entre 2 hojas de papel celofán.

Composición de las soluciones de tinción:

Solución 1: 0,5 % ácido acético glacial.

10% etanol absoluto

Solución 2: 0,2 % nitrato de plata en agua

Solución 3: hidróxido de sodio 0,75 M

Formaldehído 0,66 %

### **5.3.5 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR**

El peso molecular se determina por comparación con los marcadores moleculares Low DNA ladder (Fermentas); Ultra Low DNA ladder (Fermentas); y productos de amplificación de tamaño conocido de individuos cuyo ADN fue previamente secuenciados.

### **5.3.4 SECUENCIACIÓN**

A partir de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos diseñados para ese fin, se envía a secuenciación automática.

### **Separación del producto de PCR en gel de agarosa, y obtención de producto para secuenciar**

Luego que la migración en el gel de agarosa ha permitido una buena separación de la banda a purificar se extrae la sección que contiene la banda correspondiente al fragmento amplificado. Esta se coloca en un tubo eppendorff de 0.5mL el que previamente se perforó en el fondo con una aguja y se colocó lana de vidrio. Este tubo de 0.5mL se coloca en un tubo eppendorff de 1.5mL y se centrifuga por 5 minutos a 4000rpm. Se recoge el eluido y se precipita con 1/10 vol. de LiCl 4M y 2.5 vol. de etanol 95%. Se deja precipitando toda la noche a -20°C, se centrifuga 30 minutos a 12000rpm, se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende con agua estéril para analizarlo en un gel de poliacrilamida.

## **Análisis de resultados de secuenciación**

Una vez secuenciado se leyeron las correspondientes secuencias con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA EH.

Se realizó el diagnóstico de 23 individuos, de los cuales 10 son integrantes de los 3 grupos familiares estudiados, mientras que los 13 restantes no están emparentados. De los 23, 17 fueron positivos para la mutación de EH, 2 de ellos asintomáticos, de los otros 6 restantes, 2 de ellos se le solicitó el diagnóstico ya que correspondían a familiares afectados de un grupo familiar estudiado, y los otros 4 fueron derivados por neurólogo, a pesar de sus síntomas ninguno de ellos presentó la mutación. Además se realizaron 60 muestras control para el estudio de frecuencia de los alelos en población normal.

Para la determinación del número de repetidos CAG, en forma inicial se diseñó un sistema de primers, EHF y EHR de manera de amplificar una región más amplia, obteniendo un tamaño del amplicón de 222 pb. Pero de esta forma se amplificaban tanto los repetidos CAG, que dan origen a la patología, como también se amplificarían los repetidos CCG que se encuentran a continuación en dirección 3'. Este sistema amplificaba correctamente pero, los triplete CCG en ocasiones se encuentran también expandidos por lo que no iba a poder definirse en forma específica la cantidad de repetidos CAG motivo del diagnóstico.

Debido a este inconveniente hubo que modificar los primers y se utilizaron los recomendados por The Huntington's Disease Collaborative Research Group, que son HD1 y HD2 que amplifican selectivamente las repeticiones CAG, excluyendo las repeticiones CCG. 2 (fig 5)



Fig 5-Esquema de primers utilizados indicando región de repetidos y pares de primers utilizados, EHF y EHR que flanquean los repetidos CAG y también los repetidos CCG; HD1 y HD2 flanquean únicamente la región de repetidos CAG, estos últimos fueron los primers utilizados para realizar el diagnóstico

Mediante la corrida electroforética se determinó el tamaño de las bandas en comparación con control positivo y marcador de peso molecular de manera de establecer primariamente la cantidad de repetidos de los pacientes. (Fig 6)

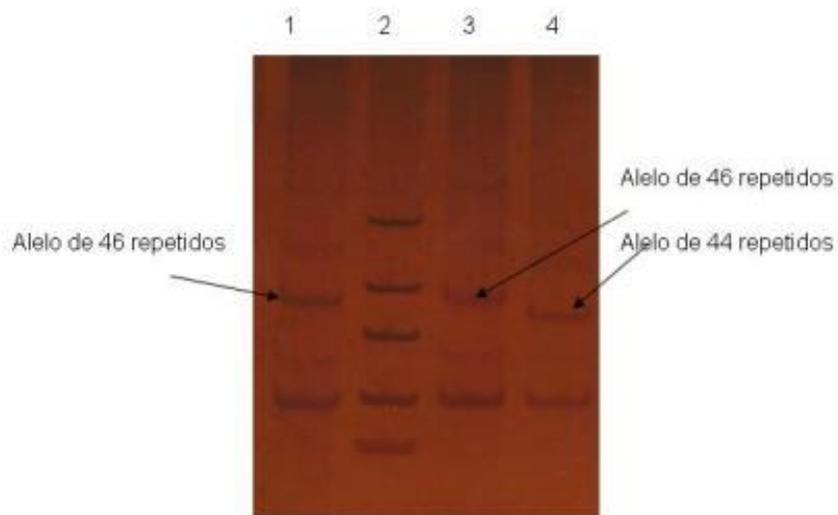


Fig 6 Gel de poliacrilamida al 6 %, revelado con nitrato de plata. Carriles 1 y 3: paciente con 46 repeticiones; carril 4: paciente con 44 repeticiones; carril 2: marcador de Peso Molecular.



## **6.2 RELEVAMIENTO DE DATOS CLÍNICOS DE LAS HISTORIAS.**

El relevamiento de los datos clínicos de los pacientes, se realizó en consulta con el médico, mediante una profunda anamnesis haciendo hincapié si el consultante presenta discapacidad motora progresiva tipo corea, si está afectado el movimiento voluntario, que tipo de trastorno mental presenta el paciente como deterioro cognitivo, cambios en la personalidad y/o depresión, y antecedentes familiares concordantes con una herencia autosómica dominante. De acuerdo a en que etapa está el paciente se analizan distintos síntomas. Si la consulta se realiza con los primeros síntomas se estudia si el paciente presenta torpeza en sus movimientos, agitación, irritabilidad, apatía, ansiedad, desinhibición, alucinaciones, movimientos oculares anormales, o depresión. En etapas medias se presta mayor atención a los síntomas tales como distonía, movimientos involuntarios, problemas con el equilibrio y al caminar, corea, movimientos retorcidos, sacudidas, tambaleo, marcha inconexa, problemas con la destreza manual, movimientos voluntarios lentos, dificultad para iniciar el movimiento, y otros, y en etapas avanzadas se pueden observar síntomas tales como, rigidez, bradiquinesia, corea grave, pérdida de peso, incapacidad para caminar y para hablar, dificultad para la deglución corriendo riesgo de asfixia, incapacidad para cuidar de sí mismo.

### 6.3 ESTUDIO DE LA EXPANSIÓN DE TRIPLETES CAG.

Todos los pacientes estudiados resultaron ser heterocigotos, presentando un alelo normal y el otro expandido. El número de repetidos de la triplete CAG en los alelos mutados (expandidos) varía entre 39 a 55 repeticiones, siendo los alelos más comunes los de 40 y 46 repetidos. Mientras que para el alelo normal la variación fue entre 16 y 23 repetidos (tabla 1) (Fig 9).

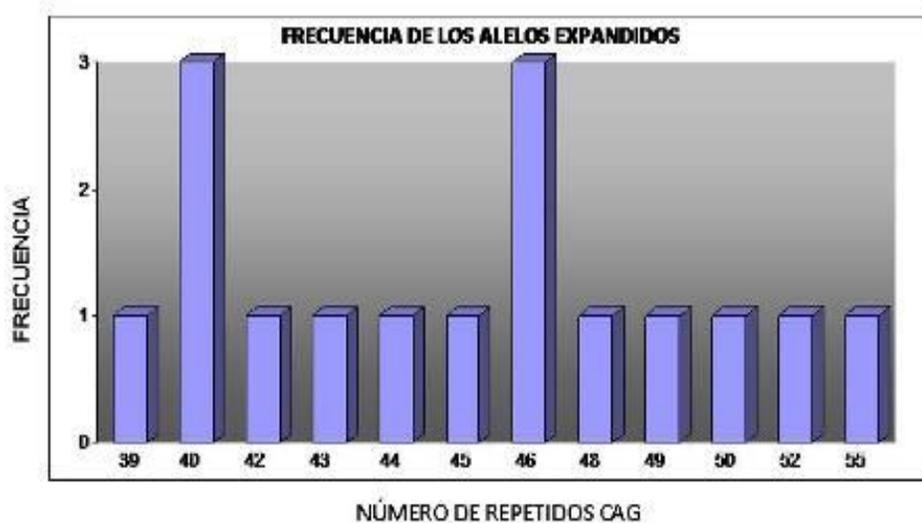


Fig 8 Frecuencia de los alelos expandidos, se representa en el eje de abscisas la cantidad de repetidos de los alelos, y en el eje de ordenadas la frecuencia.

De los dos individuos asintomáticos un individuo presentaba 40 repetidos y el otro presentaba 44 repetidos, siendo sus edades 52 y 29 años respectivamente. (tabla1)

Pacientes	Transmisión	Edad aparición síntomas	Repetidos CAG
1	M	30	46/17
2	M	28	50/17
3	M	Asint.	44/17
4	P	82	40/16
5	P	14	55/23
6	P	40	39/17
7	P	58	42/17
8	M	Asint.	40/17
9	P	45	43/17
10	P	43	46/17
11	P	63	40/17
12	P	42	46/17
13	P	38	45/16
14	M	30	49/19
15	P	40	48/17
16	P	36	52/17
17	P	Síntomas leves	38/17

Tabla 1: resultado de diagnóstico molecular de pacientes con amplificación de la secuencia CAG, causante de la EH

Se encontró además que en 12 de los casos de transmisión de alelos expandidos, fueron transmitidos por vía paterna, correspondiendo a un 70,5 %, 4 de ellos de una misma familia; y 5 de los alelos expandidos fueron transmitidos por vía materna, correspondiendo a 29,5 %, y de estos 3 de ellos pertenecientes a una misma familia. Para los alelos normales (no expandidos) en estos 17 individuos, presentaron entre 16 y 23 repeticiones con un promedio de 17,4, en la población normal estudiada el promedio fue de 17,9.

## 6.4 GENEALOGÍAS

### 6.4.1. ANALISIS DE UN GRUPO FAMILIAR

Se detecto en la policlínica de movimientos anormales del Hospital de Clínicas, hace muchos años una numerosa familia con varias generaciones que permitió un más amplio estudio. Entre los integrantes de esta familia uno de ellos ya fallecido estaba diagnosticado molecularmente, en el exterior.

Esta familia (Figura 9) nos permite apreciar todas las características clínicas de la afección:

1. un patrón de herencia autosómico dominante con afectados en todas las generaciones y transmisión de padre a hijo;
2. fenómeno de anticipación, comprobado tanto a nivel clínico con una edad de comienzo de los síntomas menor y un curso con una progresividad mayor, así como a nivel molecular donde se verifica una pasaje de 39 a 55 repetidos CAG en una transmisión padre a hijo (individuos III5 y IV6);
3. una expresividad clínica y edad de comienzo variable, aún entre individuos que portan el mismo número de repetidos CAG (véase individuos: II6, III5, III9 y III10);
4. una gran variedad de expresión clínica, con individuos que presentan desde el inicio una corea típica y otros que comienzan con síntomas de la esfera psiquiátrica, con trastornos de personalidad y otros síntomas premotores.

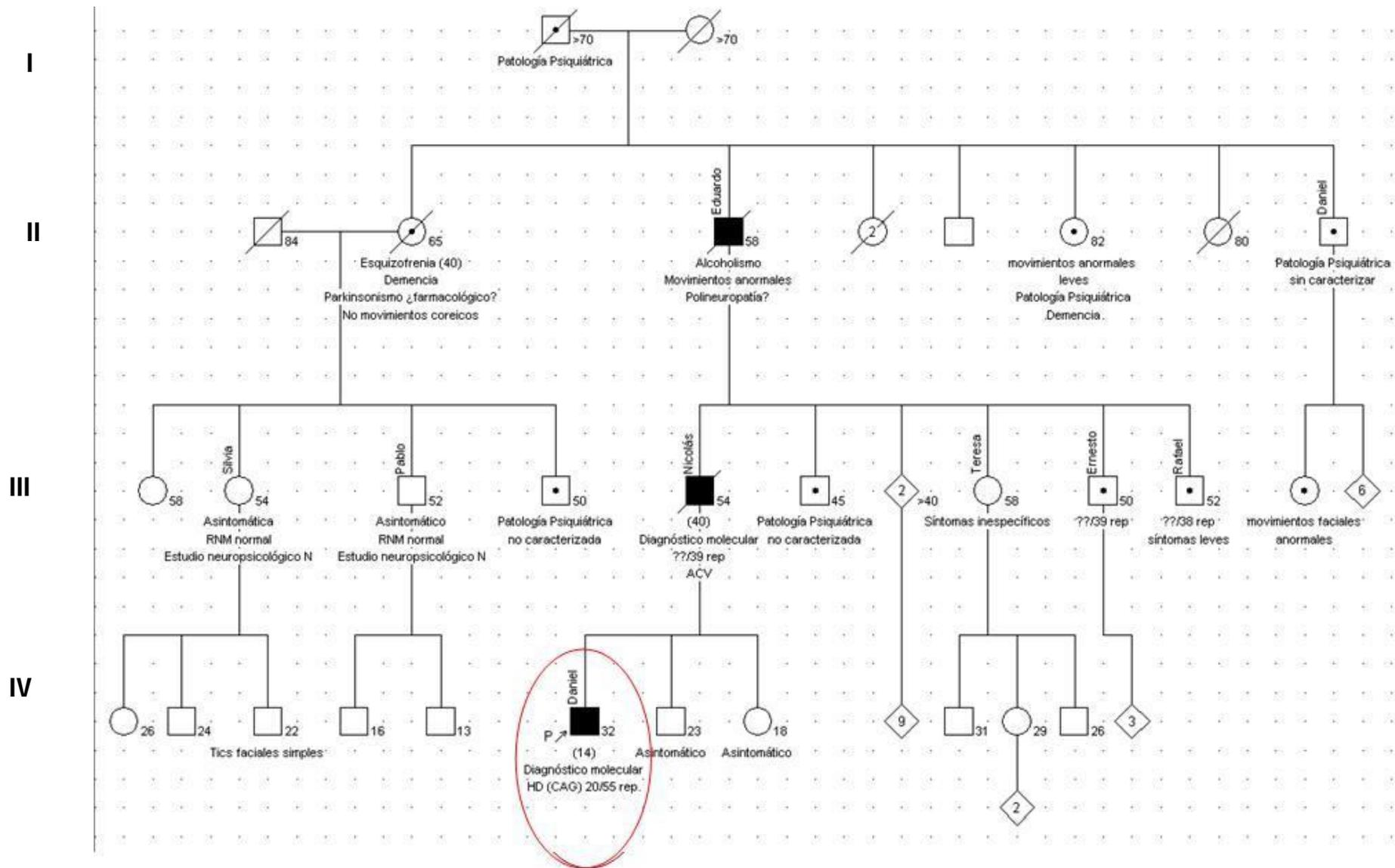


Fig 9 Genealogía de familia 1 estudiada

## 6.4.2. ANÁLISIS DE OTROS GRUPOS FAMILIARES

Dentro de otras familias estudiadas, encontramos las mismas características que la familia anterior, por ejemplo en la familia 2 (Fig. 10) vemos que el padre afectado muere a los 63 años de edad, individuo I2, desconociendo la cantidad de repetidos, forma dos parejas y tiene hijos con ambas, de uno de ellas quedan dos hijos que están diagnosticados con Enfermedad de Parkinson, II1, II2, y de la otra pareja quedan 3 hijas mujeres y un varón, una de las mujeres se encuentra afectada con 47 años, II3, habiendo comenzado sus síntomas a los 43 años a la que se le realizó el diagnóstico molecular y tiene 46 repetidos CAG.

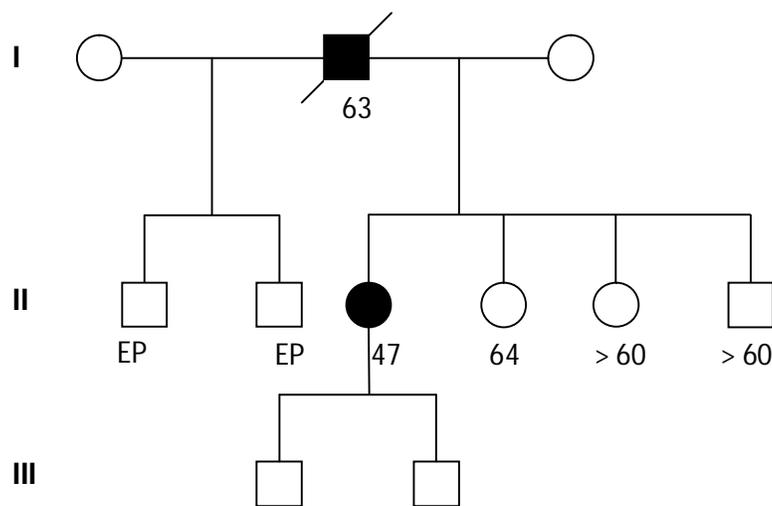


Fig 10: Esquema de genealogía de familia 1 afectada por EH.

En la familia 3, (Fig. 11) tenemos datos de cinco generaciones, con el individuo I1, y II2, que fallecen con EH, desconociendo la edad de los mismos, en la tercera generación, III2, aparece una mujer con 47 años diagnosticada clínicamente habiendo comenzado su síntomas aproximadamente a los 38 años. En la cuarta generación de los 5 individuos que la componen observamos el individuo IV1, que tiene 45 años y sufre de depresión, no tiene diagnóstico clínico ni molecular de EH, el IV2 fallece con 43 años y presentaba sintomatología para EH desde los 39 años; en esta generación se le realizó el diagnóstico molecular a IV3, IV4, y IV5 estando las dos primeras ya afectadas, con diagnóstico clínico confirmado con el diagnóstico molecular, y tienen un genotipo de 46, y 50 repetidos CAG, respectivamente, el IV5 permanece asintomático, con 29 años de edad, solicitando que se le realizara el diagnóstico molecular y presenta 44 repetidos CAG. La V generación en su mayoría son menores de edad no presentando síntomas, no se realiza el diagnóstico molecular.

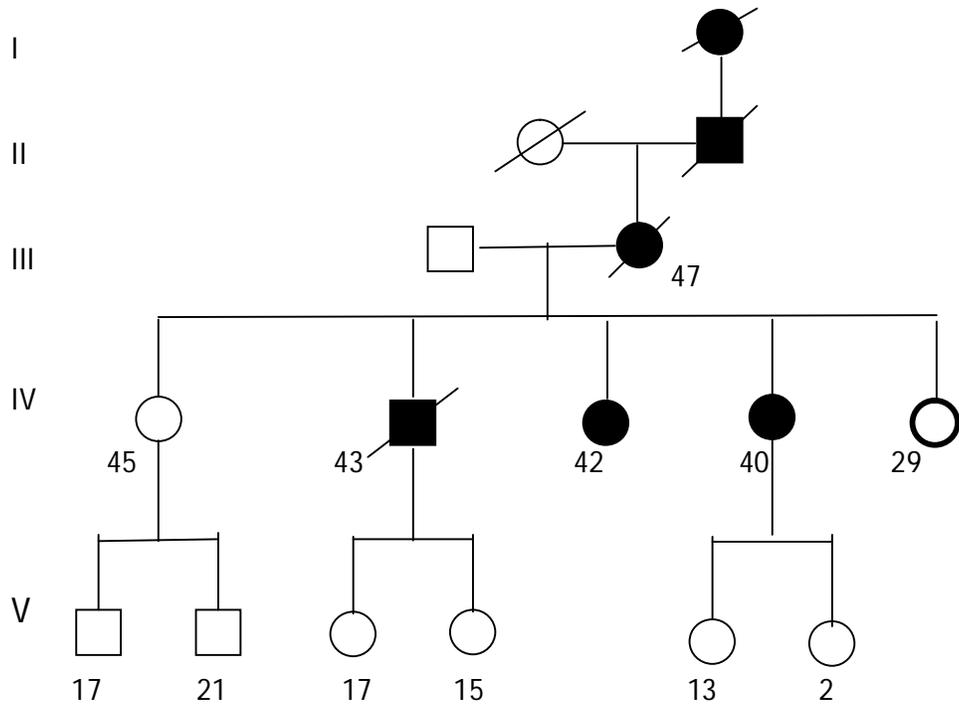


Fig 11 Esquema de genealogía de familia 3 afectada por EH

Para construir una genealogía, es necesario a la hora de la consulta realizar un buen interrogatorio de la historia familiar del paciente. Recabando la mayor cantidad de datos posibles de las generaciones anteriores, de la misma generación y de la generación posterior.

## **6.5. ESTUDIO DE LA EDAD DE INICIO DE LOS SÍNTOMAS EN RELACIÓN A LOS REPETIDOS CAG**

Se pueden clasificar los pacientes de acuerdo a la edad de inicio de los síntomas, en tres diferentes grupos: edad de inicio precoz, que incluye la niñez y en la juventud, edad de inicio en la adultez que comienza a partir de los 20 años, y edad de inicio tardía en pacientes más allá de los 50 o 60 años.

Se define la edad de inicio de la enfermedad como la edad en que aparecen los primeros síntomas, por lo que la misma surge del interrogatorio del médico en la primera consulta. En este estudio, la edad de inicio promedio encontrada fue de 42 años. Si vemos la distribución del número de casos estudiados (tabla2), a los que se le realizó el diagnóstico molecular según la edad que comenzaron a presentar síntomas, la mayoría desarrollaron la EH en la cuarta década de la vida.

<b>Número de individuos afectados</b>	<b>Edad de Inicio (años)</b>
<b>1</b>	<b>&lt; 20</b>
<b>1</b>	<b>&lt; 30</b>
<b>4</b>	<b>30-39</b>
<b>6</b>	<b>40 -50</b>
<b>1</b>	<b>50 - 60</b>
<b>1</b>	<b>60 - 70</b>
<b>1</b>	<b>&gt; 70</b>

Tabla 2. Distribución del número de personas afectadas según la edad de inicio de la EH

Se destaca el caso del paciente IV6 (Fig 9) que con 55 repetidos comenzó con los síntomas siendo menor de 20 años, EH juvenil, y 3 pacientes con EH de inicio tardío.

El factor más importante que influencia la edad de inicio en la EH, es la longitud de las repeticiones expandidas CAG, hay una correlación inversa marcada entre la cantidad de repetidos y la edad de inicio de la patología, demostrada ampliamente en toda la bibliografía. A pesar del pequeño número de casos con los que contamos la correlación negativa es visible con un  $r = -0,78$ . Teniendo en cuenta que dado que tenemos dos casos asintomáticos este coeficiente de correlación se calculó sólo con los 14 casos restantes. (Fig 12).

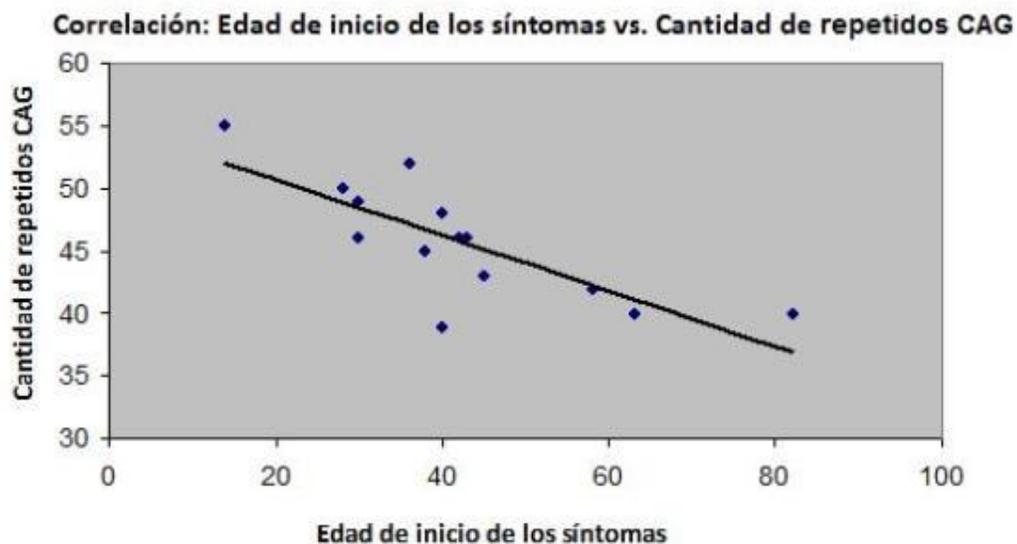


Fig 12 Gráfico de correlación entre la edad de inicio de los síntomas y la cantidad de repetidos CAG.

Mediante regresión lineal, se estima la edad de inicio de los síntomas de acuerdo a la ecuación  $y = -0,2214x + 55,1$ , y se calcula la diferencia entre la edad real de inicio de los síntomas y la edad estimada por la ecuación. (tabla 3)

<b>Pacientes</b>	Edad aparición síntomas	Repetidos CAG	Edad de inicio por regresión	Dif de Edad de inicio y Edad predecida por regresión
1	30	46/17	41	11
2	28	50/17	23	-5
3	Asint.	44/17		
4	82	40/16	68	-14
5	14	55/23	0	-14
6	40	39/17	73	33
7	58	42/17	59	1
8	Asint.	40/17		
9	45	43/17	55	10
10	43	46/17	41	-2
11	63	40/17	68	5
12	42	46/17	41	-1
13	38	45/16	46	8
14	30	49/19	28	-2
15	40	48/17	32	-8
16	36	52/17	14	-22

Tabla 3: Edad de inicio de los síntomas estimada por regresión lineal y diferencia con edad real de aparición de los síntomas.

## 6.6. ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES MODIFICADORES:

En el caso de repetidos CCG, (tabla 4) se realizó la comparación de estos repetidos en pacientes con EH, y una población normal, no se encontraron diferencias entre los porcentajes de repetidos CCG, expresados en pacientes o en población normal.

Tamaño del alelo CCG	6	7	9	10	12
% en Pacientes con EH	12,5	69	12,5	6	0
% en Población Normal	12,5	62,5	3,3	15,7	3,3

Tabla 4: Tamaño de alelo CCG y % de población en pacientes con EH y población Normal.

Para los restantes polimorfismos se analizaron 16 de los pacientes diagnosticados, se muestran los resultados en la tabla 5.

En el gen ApoE, se encontró que la mayoría de los pacientes portaban el genotipo E3/E3, que es el más frecuente y no se ha visto asociado con ningún tipo de patología neurodegenerativa para los genotipos E3/E4 y E2/E3, sólo encontramos 6,25 % de cada uno.

Para el polimorfismo en ADORA2A, el genotipo normal es CC y es el alelo T el que anticiparía la edad de inicio en cuatro años, 3 pacientes son homocigotas para el genotipo TT, 18,75 % y siete son heterocigotas CT, un 43,75 %.

En el caso de PPARGC1A, que el genotipo que retrasa es el CC, se encontró solo dos pacientes que portaban CT, representando un 12,5 %.

En el polimorfismo del gen HAP1, el genotipo normal es GG, y se encontró un paciente GA y un paciente AA, correspondiendo 6,25 % para cada uno.

En el gen UCHL1 todos los pacientes son homocigotas CC, que es el genotipo ancestral.

En la In/del 2642, sólo un paciente mostró la delección, siendo homocigota para la misma, representando un 6,25 %.

Paciente	Repetidos CCG	ApoE	ADORA2A	PPARGC1A	HAP1	UCHL1	In/Del 2642
1	7/6	E3/E3	TT	TT	GG	CC	II
2	7/7	E3/E3	CT	TT	GG	CC	II
3	7/7	E3/E3	CC	TT	GG	CC	II
4	6/9	E3/E3	CC	CT	GG	CC	II
5	10/7	E3/E3	CT	CT	GG	CC	II
6	9/7	E3/E3	TT	TT	GG	CC	II
7	9/6	E3/E4	CC	TT	GG	CC	II
8	6/7	E3/E3	CC	CT	GG	CC	II
9	7/9	E3/E3	CT	TT	GG	CC	II
10	7/7	E3/E3	CC	TT	GG	CC	II
11	7/7	E3/E3	CT	TT	AA	CC	II
12	7/7	E3/E3	CT	TT	GG	CC	II
13	7/10	E2/E3	CT	TT	GG	CC	II
14	7/7	E3/E3	CC	TT	GG	CC	II
15	7/7	E3/E3	CT	TT	GA	CC	II
16	7/7	E3/E3	TT	TT	GG	CC	DD

Tabla 5: Resultados de los polimorfismos en los genes modificadores de la edad de inicio en la EH.

## 7. DISCUSION

Cuando se localizó el primer marcador genético asociado a la EH (1983) en el cromosoma 4, se iniciaron los trabajos para establecer su diagnóstico, por técnicas de ligamiento. Recién cuando se identificó el gen HTT, 10 años más tarde, y se encontró la mutación responsable de la patología, fue que se pudo desarrollar un diagnóstico molecular directo. Hasta ese momento, el diagnóstico definitivo de la presencia de la Enfermedad de Huntington se debía hacer por una historia familiar consistente con patrón de herencia autosómica dominante, una discapacidad motora progresiva, síntomas clásicos de movimientos involuntarios, trastornos mentales incluido un deterioro cognitivo, al igual que trastornos afectivos y cambios de personalidad.<sup>62</sup>

El diagnóstico molecular puede realizarse en pacientes sintomáticos, como confirmación de un diagnóstico clínico, y/o para descartar diagnósticos diferenciales. También se realiza como test predictivo en individuos asintomáticos pero en riesgo de haber heredado la mutación.

En general, los análisis genéticos son de gran utilidad en la confirmación del diagnóstico clínico y en el diagnóstico presintomático, pero estos diagnósticos no pueden predecir cuándo empezaran los síntomas ni cómo será la evolución de la enfermedad. Asimismo, existen muchos cuadros clínicos que presentan trastornos del movimiento y que podrían confundirse con la EH, por los que en estos casos de duda el diagnóstico genético es de gran ayuda para establecer un diagnóstico diferencial adecuado.

Las modalidades para realizar el diagnóstico molecular incluyen variadas metodologías, basadas en la PCR con la posterior detección de los fragmentos obtenidos en geles de poliacrilamida, tanto por marcado radioactivo o tinción con plata, como por secuenciación. En este estudio se utilizó el método de PCR, el revelado con tinción con nitrato de plata por ser una técnica más simple, y económica. Se utilizó la secuenciación para la verificación de los resultados obtenidos.

El diagnóstico molecular consiste en determinar el tamaño exacto de la repetición CAG presente en el exón 1 del gen HTT. Los alelos normales, más comúnmente reportados en la bibliografía se encuentran entre 17 y 20 repetidos. En nuestros pacientes la repetición más frecuente fue entre 17 y 19 repetidos, y respecto al número expandido de repeticiones la mayor frecuencia encontrada fue la de los alelos con 40 a 50 repetidos.<sup>63,64,65,66</sup> (ver figura 8)

El factor más importante que influye sobre la edad de inicio en la EH, es la longitud de las repeticiones expandidas CAG, hay una marcada correlación inversa entre la cantidad de repetidos y la edad de inicio de la patología, demostrada ampliamente en toda la bibliografía.

Por tratarse de una afección autosómica, tanto hombres como mujeres son afectados en iguales proporciones y en nuestro grupo de individuos afectados encontramos una distribución de 8 mujeres y 9 hombres. Como es una enfermedad dominante, generaciones sucesivas en una misma familia están afectadas, como se puede observar en la genealogía de la familia 1. (Ver Figura 9). Cabe recalcar que tanto hombres como mujeres transmiten la mutación, y en nuestro estudio fueron 5 transmisiones maternas y 12 transmisiones paternas.

Podemos encontrar una mayor amplificación paterna en el caso del individuo III5, (ver figura 9), en que encontramos el padre individuo que tiene 39 repetidos y su hijo IV6 con 55 repetidos.

Asimismo, la enfermedad de Huntington juvenil tiene una prevalencia mucho menor, en este pequeño grupo encontramos un caso, que además el número de repetidos no coincide con lo reportado para la mayoría de los casos de EHJ ya que generalmente se ha visto que tienen > 60 repetidos, y en este caso tiene tan sólo 55 repetidos, y un inicio de la enfermedad en los 14 años.

Con respecto a la edad de inicio en el grupo estudiado, podemos observar que está representado todo el espectro de edades de inicio de los síntomas la mayoría de los pacientes, 10 de ellos, tienen inicio de los síntomas entre los 30 y los 50 años, coincidiendo en que la edad de inicio de los síntomas es alrededor de la cuarta década de la vida. Encontramos 3 pacientes que presentan sus primeros síntomas a partir de los 50 años, corte menor en edad para la EHIT, en estos casos la sintomatología es de desarrollo más lento, con síntomas que pueden enmascararse con otros problemas de salud, pero que muestran más frecuentemente signos de depresión antes que anormalidad en los movimientos.

Observamos además que uno de los pacientes con un alelo de 39 repetidos, (ver tabla 4) alelo definido por las Guías y Técnicas Standards para el análisis de la EH, como un alelo de penetrancia reducida, y definido como meióticamente inestable, en este caso el paciente presenta sus primeros síntomas a los 40 años,<sup>67</sup> cuando si solo estuviera influenciada la edad de inicio de los síntomas por la cantidad de repetidos CAG debería

comenzar con sus síntomas en la década de los 70 años, de acuerdo a nuestro cálculo en la regresión lineal.(ver tabla3 resultados).<sup>68</sup>

A pesar de estas excepciones esta correlación inversa se puede observar en las pocas familias estudiadas con un leve descenso en la edad de inicio de las generaciones siguientes respecto a las generaciones parentales.

Otro hecho interesante es que a pesar de que haya pacientes que tienen la misma longitud de repetidos CAG, o sea el mismo genotipo, es poco probable que muestren el mismo fenotipo, o sea que presenten los mismos síntomas ya sea trastornos del movimiento, alteraciones psiquiátricas o cognitivas, y especialmente que comiencen a la misma edad, lo que nos indica que existen otros factores ya sea genéticos, o ambientales que están modificando, como se expresa la EH.

Muchos estudios han sugerido la existencia de genes modificadores, genes que por su variación polimórfica contribuirían a la alteración del desarrollo de los síntomas y que ofrecen nuevas perspectivas para entender la patogénesis de la enfermedad, los cambios bioquímicos y de las vías metabólicas que en ella se producen mucho antes del diagnóstico,<sup>69</sup> .El estudio de genes modificadores ofrece la posibilidad de explicar estos cambios en edad de aparición de los síntomas así como para aplicar otras técnicas terapéuticas.

Como nuestro estudio cuenta con tan sólo 17 pacientes, y es un muy escaso número para realizar pruebas estadísticas, se ha realizado un análisis caso por caso teniendo en cuenta todos los datos obtenidos.

## 7.1 POLIMORFISMOS

Se analizaron los polimorfismos en conjunto, en cada uno de los pacientes que se encontró que pudiera tener relevancia, y se procura con el modelo de regresión, poder acercarnos en el estudio de la variación de la edad en la EH.

El paciente 1 perteneciente a la familia 2, expresa un número de repetidos CAG de 46, inició sus síntomas a los 30 años., si sólo se tuviera en cuenta el número de repetidos y por el modelo de regresión estudiado, observamos un adelanto de 11 años (ver tabla 3). Encontramos este paciente es homocigoto para el alelo T del gen modificador ADORA2A, y éste es el genotipo que anticipa la edad de inicio de los síntomas por lo que este polimorfismo podría ser responsable de un adelantamiento de la edad de inicio de los síntomas.

En el caso del paciente 13, que tiene 45 repetidos CAG, y un adelanto en la edad de inicio de acuerdo al modelo, encontramos que tiene el genotipo CT para el gen ADORA2A, que podría justificar el adelanto en la edad de inicio.

El paciente 4 y el paciente 8 se analizan en conjunto, por pertenecer a la misma familia 1, integrantes II6, y III3, ellos tienen una cantidad de 40 repetidos CAG, zona gris, son estos pacientes con esta cantidad de repetidos que pueden permanecer asintomáticos hasta más de los 70 u 80 años de edad y además presentan las mismas variantes para los genes modificadores; el paciente 4 comienza con sus síntomas a los 82 años, y el paciente 8 con 52 años permanece asintomático hasta el momento, y comparten además un alelo C para el gen PPARGC1A, que retrasaría la

edad de inicio de los síntomas, por lo que podríamos pensar que el paciente 8 podría permanecer asintomático, unos 20 años más.

Podemos ver que el paciente 6, con 39 repetidos CAG, se encuentra también al igual que los dos pacientes anteriores en la zona gris, pertenece también a la familia 1, individuo III5, por el modelo debería comenzar sus síntomas a los 73 años, pero presenta síntomas a los 40 años; tempranamente para la cantidad de repetidos. La presencia del genotipo TT para ADORA2A, que se asocia con una anticipación de los síntomas podría ayudar a explicar este fenómeno.

Si analizamos el paciente que presenta EHJ, paciente 5, (familia1) IV6, que comenzó con sus síntomas a los 14 años, con una amplificación de 55 repetidos CAG, que tiene un retraso importante en la edad de aparición de los síntomas, ya que según el modelo de regresión la posible edad estimada para el inicio de los síntomas de este paciente es de 1 año vemos que presenta para el gen ADORA2A, un alelo T, alelo que provocaría adelantamiento de los síntomas, pero también presenta un alelo C para el gen PPARGC1A., que retrasa los síntomas por lo que sería este último polimorfismo, que tendría más influencia en este paciente y podría explicar así esa diferencia de edad en la aparición de los síntomas.

El paciente 9, tiene 43 repetidos CAG, y comenzó sus síntomas a los 45 años, y por el modelo debería haber comenzado a los 55 años, por lo que tiene un adelanto de 10 años, y se podría justificar el adelanto por el alelo T en el gen ADORA2A, que presenta.

El paciente 11, se encuentra en la zona gris, con 40 repetidos CAG, e inició sus síntomas a los 63 años, por el modelo de regresión los debería haber

iniciado a los 68 años, nuevamente al igual que los pacientes 4,8,y 6, se encuentra en la zona gris, y expresa un alelo T en el gen ADORA2A, que provoca un adelanto de los síntomas, aunque en este caso es menor la cantidad de años que se adelantó, pero tiene un genotipo homocigota, AA para HAP1, que es protectorio, por lo que en este caso tendría más peso el polimorfismo del gen ADORA2A.

El paciente 12, tiene 46 repetidos CAG, con sólo el retraso en la edad de inicio de tan sólo un año la presencia del alelo T para el gen ADORA2A, no podríamos verlo como influyendo en la edad de inicio de los síntomas.

El paciente 15 con 48 repetidos CAG, tiene un retraso en la edad de inicio de los síntomas de 8 años, que también presenta un alelo T para el gen ADORA2A, pero en este caso el paciente expresa también el alelo A para el gen HAP1, que es éste alelo el protectorio, y podría explicar el retraso en la edad de inicio de los síntomas.

El paciente 16 tiene una amplificación de 52 repetidos CAG, de acuerdo a la regresión debería haber comenzado sus síntomas antes de los 20 años, pero tiene un retraso de aproximadamente 2 décadas, si bien es homocigota para T en el gen ADORA2A, y homocigota también para la delección 2642, que también adelantaría los síntomas en este caso no podemos explicar con el estudio de estos polimorfismos, por lo que son otros los factores ya sea genéticos o ambientales que influyen en este paciente.

Surge de este análisis, que de los polimorfismos estudiados en los genes modificadores, que tendría mayor influencia es el gen ADORA2A, o por lo menos es el que explicaría en la mayoría de los casos en que aparece el

adelanto en la edad de los síntomas. Con una marcada influencia cuando aparece en la zona gris, o sea en los individuos que expresan 39, o 40 repetidos.

## 8. CONCLUSIONES

- Los objetivos de esta investigación se cumplieron.
- Se puso a punto el diagnóstico de la EH, mediante la técnica de PCR, y posterior análisis de gel de poliacrilamida con tinción en Nitrato de plata.
- El diagnóstico de la EH es ahora posible en Uruguay, esperando que contribuya para el diagnóstico correcto de los pacientes y sus familias.
- Se han identificado las primeras familias portadoras de EH en nuestro país, y en todos los casos posibles se realizó su genealogía.
- El diagnóstico molecular provee la identificación de la patología, permitiendo así un mejor tratamiento terapéutico de la misma.
- El diagnóstico preciso de la mutación inestable CAG, asociada a la EH permitió detectar correctamente a las personas clínicamente afectadas.
- No se encontró una diferencia en la magnitud de la expansión de tripletes CAG, según el sexo del progenitor que transmitió la mutación.
- Se comprobó que existe una correlación negativa de las repeticiones expandidas y la edad de inicio de los síntomas.
- Se pusieron a punto las técnicas para la amplificación de los polimorfismos, postulados como posibles modificadores de la edad de inicio de los síntomas en la EH.
- Si bien las asociaciones encontradas de los polimorfismos en los genes modificadores, con la variación de la edad de inicio de los síntomas en la EH, fueron analizadas individualmente por el escaso número de pacientes con los que contó el estudio, no podemos

descartar la presencia de los mismos, esperando realizar estudios estadísticos con un mayor número de casos que nos permitan concluir acerca de estos pequeños hallazgos.

## **8.1 PERSPECTIVAS**

Esperamos que este trabajo sea el inicio de un estudio con una mayor población para poder realizar cálculos estadísticos con un mayor número de casos, que nos permiten estudiar la asociación o no de los polimorfismos en los genes modificadores que pudieran confirmar las observaciones y datos presentados.

El conocimiento mejor de las características moleculares de esta enfermedad, aportará información de utilidad para un mejor tratamiento farmacológico, y por ende una mejor calidad de vida.

## Bibliografía

---

- 1 White FR, Vasterling JJ, Koroshetz WJ, Myers R. Neuropsychology of Huntington's disease. In: White R, editor. Clinical syndromes in adult neuropsychology: the practitioner's handbook. Amsterdam: Elsevier 1992; 213-48.
- 2 Nance MA y Myers RH. Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2001; 7:153-7
- 3 Usdin K, Grabezyk E. DNA repeat expansions and human disease. Cell Mol Life Sci 2000; 57: 914-31. La Spada AR. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. Brain Pathology 1997; 7: 943-63.
- 4 Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N." The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis.", Mov Disord. 2012 Aug;27(9):1083-91
- 5 Wallerstein, C. Huntington's centre faces closure. B.M.J. 2000 7258)- 404.
- 6 Paradisi I, Hernández A, Arias S,"Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation" J Hum Genet (2008) 53:127–135
- 7 Bates G, Tabrizi S, Jones L "Huntington's Disease" Oxford University Press, Mar 20, 2014
- 8 Torres L, Cosentino C, Mori N, " Actualización sobre la enfermedad de Huntington y experiencia de 30 años en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas" Rev Per Neurol 1997;3:9-12
- 9 Gatto E, Parisi V, I Persi G, Conversoc D, Etcheverrya JL, Varela V, Albad L, Fretcheld G, "Clinical and genetic characteristics in patients with Huntington's Disease from Argentina" Elsevier Parkinsonism and Related Disorders 18- 2012-166e169
- 10 Santos de Souza Alencar M A, "CURRENTLY PREVALENCE OF HUNTINGTON'S DISEASE IN FEIRA GRANDE- ALAGOAS/NORTHEASTERN BRAZIL" World Congress of Huntington's disease, september 2013
- 11 Thompson J, Snowden J, Craufurd M, Neary D, Behavior in Huntington's Disease: Dissociating Cognition-Based and Mood-Based Changes, The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences 2002; 14:37–43
- 12 Riba P, Nguyen K, Hahn-Barma V, Gourfinkel-An I, Vidailhet M, Legout A, Dode C, Brice A, Durr A, "Psychiatric and Cognitive Difficulties as Indicators of Juvenile Huntington Disease Onset in 29 Patients" Arch Neurol. 2007;64:813-819
- 13 De la Cerda Santa María A, Moreno-López C L, Muñoz García E, "Enfermedad de Huntington de inicio tardío" Alzheimer. Real Invest Demenc.2008;40:14-20
- 14 Morton J, "Molecular Pathogenesis of Huntington's Disease" Review Article Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation 2004 4 (1) 9-11
- 15 Tang T, Chen X, Liu J, Bezprozvanny I "Dopaminergic Signaling and Striatal Neurodegeneration in Huntington's Disease" The Journal of Neuroscience, July 25, 2007 • 27(30):7899–7910 • 78 99

- 
- 16 Roze E, Cahill C, Martin E, Bonnet C, Vanhoutte P, Betuing S, Caboche J, "Huntington's disease and striatal signaling." REVIEW ARTICLE Université Montpellier 2011 23 August
- 17 [www.uninet.edu/union99/congress/confs/dem/02Barquero.html](http://www.uninet.edu/union99/congress/confs/dem/02Barquero.html)
- 18 Young AB, Penney JB, Starosta-Rubinstein S, Markel DS, Berent S, Giordani B, Ehrenkauser R, Jewett D, Hichwa R, "PET scan investigations of Huntington's disease: cerebral metabolic correlates of neurological features and functional decline." *Ann Neurol* 1986 20:296-303
- 19 Beenen N, Büttner U, Lange HW. "The diagnostic value of eye movement recordings in patients with Huntington's disease and their m offspring." *Electroencephalography Clin Neurophysiol.* Feb 1986;119:27
- 20 Koller WC, Trimble J "The gait abnormality of Huntington's disease." *Neurology* 1985, 35:1450-1454
- 21 Leopold N, Kagel M, "Dysphagia in Huntington's Disease " *Arch Neurol.* 1985;42(1):57-6
- 22 <http://www.mayoclinic.org>
- 23 Arango-Lasprilla J C, Iglesias-Dorado J, Lopera F, "Características clínicas y neuropsicológicas de la enfermedad de Huntington: una revisión" *Rev Neurol.* 2003; 37: 758-65
- 24 Arroyave P, Riveros M, "Enfermedad de Huntington" *UNIVERSITAS M?DICA* 2006 VOL. 47 N 2
- 25 Riba P, Nguyen K, Hahn-Barma V, Gourfinkel-An I, Vidailhet M, Legout A, Dode C, Brice A, Durr A, "Psychiatric and Cognitive Difficulties as Indicators of Juvenile Huntington Disease Onset in 29 Patients" *Arch Neurol.* 2007;64:813-819
- 26 Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72:971-83
- 27 Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories Molecular Subcommittee of the Laboratory QA Committee by the Huntington Disease (HD) Working Group Edition 2006
- 28 Myers M, Leavitt J, Farrer L, Jagadeesh J, McFarlane H, Mastromauro C, Mark T, Gusella J, "Homozygote for Huntington Disease" *Am. J. Hum. Genet.* 45:615-618, 1989
- 29 Squitieri F, Gellera C, Cannella M, Mariotti C, Cislighi G, Rubinsztein D, Almqvist E, Turner D, Bachoud-Le?vi AC, Simpson S, Delatycki M, Maglione V, Hayden M, Di Donato S, Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course *Brain* (2003), 126, 946-955
- 30 Landles C, Bates G Huntington and the molecular pathogenesis of Huntington's disease Fourth in Molecular Medicine Review Series Neurogenetics Laboratory, King's College London, London, UK *EMBO reports* 2004
- 31 Gomes Pereira M, "Genetic environmental modifiers of somatic trinucleotide repeat dynamics." University of Glasgow, 2002
- 32 Langbehn DR, Brinkman RR, Falush D, Paulsen JS, Hayden MR. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet* 2004; 65:267-77.
- 33 Bates G. Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 2003;361:1642-1644.
- 34 Cattaneo E, Huntington disease *News Physiol Sci* 18: 34-37, 2003
- 35 Landles C, Bates G. Huntington and the molecular pathogenesis of Huntington disease. *EMBO* 2004;5:958-963

- 
- 36 Cui L, Jeong H, Bovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D, " Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration" *Cell*. 2006 Oct 6;127(1):59-69
- 37 Li XJ, LI SH, HAP1 and intracellular trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 2005 Jan;26(1):1-3
- 38 Bhattacharyya NP, Banerjee M, Majumder P Huntington's disease: roles of huntingtin-interacting protein 1 (HIP-1) and its molecular partner HIPPI in the regulation of apoptosis and transcription *FEBS J* 2008 Sep;275(17):4271-9
- 39 Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiol Rev* 2010; 90: 905-81.
- 40 Rubinsztein D,Leggo J,Coles R,Almqvist E, Biancalana V,Cassiman JJ,Chotai K,Connarty M, Craufurd D,Curtis A,Curtis D,Davidson M,Differ AM, Dode C,Dodge A,Frontali M,Ranen N,Stine C, Sherr M,Abbott M,Franz M,Graham C,Harper P, Hedreen J,Jackson A, Kaplan J C,Losekoot M, MacMillan J,Morrison P,Trottier Y,Novelletto A, Simpson S,Theilmann J,Whittaker J,Folstein S,Ross C,Hayden M "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.* 1996 59:16-22.
- 41 Metzger S, Bauer P, Tomiuk J, Laccone F, ? DiDonato S, Gellera C, Mariotti C, Lange H, Weirich-Schwaiger H, Wenning G, Sepp K, Melegh B, Havasi V, Balikó L, Wiczorek S, Zaremba J, HoVman-Zacharska D, Sulek A, Nazli Basak A, Soydan E, Zidovska J, Kebrdlova V, Pandolfo M, Ribai P, Kadas L, Kvasnicova M, Weber B, Kreuz F, Dose M, Stuhmann M, Riess O. Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. *Hum Genet* 2006 120:285–292
- 42 Vuillaume, I, Vermersch P, Destée A, Petit H, Sablonnière B, "Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease J" *Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:758–762.
- 43 Gusella J, MacDonald M, "Huntington's disease: the case for genetic modifiers", Review, *Genome Medicine* 2009.
- 44 Pramanik S, Basu P, Gangopadhaya P, Sinha K, Jha DK, Sinha S, Das S, Maity B, Mukherjee S, Roychoudhuri S, Majumder P and Bhattacharyya N " Analysis of CAG and CCG repeats in *Huntingtin* gene among HD patients and normal populations of India" *European Journal of Human Genetics* 2000 8, 678–682.
- 45 Djoussé L, Knowlton B, Hayden MR, Almqvist EW, Brinkman RR, Ross CA, Margolis RL, Rosenblatt A, Durr A, Dode C, Morrison PJ, Novelletto A, Frontali M, Trent RJ, McCusker E, Gómez-Tortosa E, Mayo Cabrero D, Jones R, Zanko A, Nance M, Abramson RK, Suchowarsky O, Paulsen JS, Harrison MB, Yang Q, Cupples LA, Mysore J, Gusella JF, MacDonald ME, Myers RH. Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16. *Neurogenetics*. 2004 Jun;5(2):109
- 46 Arning L, Eppele J, Genetic Modifiers of Huntington's Disease *Future Neurology*. 2012;7(1):93-109.
- 47 Kehoe P, Krawczak M, Harper PS, Owen MJ, Jones AL. Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. *J Med Genet*. 1999;36(2):108-11
- 48 Saft C, Andrich J E, Brune N, Gencik M, Kraus P H, Przuntek H, Epplen J T Apolipoprotein E genotypes do not influence the age of onset in Huntington's disease *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1692–1696S
- 49 Davies J, Sarkar S, Rubinsztein D, "The ubiquitin proteasome system in Huntington's disease and the spinocerebellar ataxias" *BMC Biochemistry* 2007, 8(Suppl 1):S2
- 50 Hegde A The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity *Learn. Mem.* 2010 17: 314-327

- 
- 51 Zetterberg M, Sjölander A, Otter M, Palmér M, Landgren S, Minthon L, Wallin A, Andreassen A, Blennow K, Zetterberg H, "Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1) S18Y polymorphism in Alzheimer's disease" *Molecular Neurodegeneration* 2010, 5:11
- 52 Nazé P, Vuillaume I, Destée A, Pasquier F, Sablonnière B. Mutation analysis and association studies of the ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1 gene in Huntington's disease. *Neuroscience Letters* 2002; 328:1-4
- 53 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/135#>
- 54 Arning L, Epple J. Genetic Modifiers of Huntington's Disease *Future Neurology*. 2012;7(1):93-109.
- 55 Varani K, Rigamonti D, Sipione S, Camurri A, Borea P A, Cattabeni F, Abbraccio M, Cattaneo E "Aberrant amplification of A2A receptor signaling in striatal cells expressing mutant huntingtin" *FASEB J*. 2001 March 5, 10.1096
- 56 Dhaenens CM, Burnouf S, Simonin C, Van Brussel E, Duhamel A, Defebvre L, Duru C, Vuillaume I, Cazeneuve C, Charles P, Maison P, Debruxelles S, Verny C, Gervais H, Azulay JP, Tranchant C, Bachoud-Levi AC, Dürr A, Buée L, Krystkowiak P, Sablonnière B, Blum D; "A genetic variation in the ADORA2A gene modifies age at onset in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 2009 Sep;35(3):474-6.
- 57 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=10891](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=10891)
- 58 Soyak S, Felder T, Auer S, Hahne P, Oberkofler H, Witting A, Paulmichl M, Landwehrmeyer G B, Weydt P, Patsch W, "A greatly extended PPARGC1A genomic locus encodes several new brain-specific isoforms and influences Huntington disease age of onset" *Human Molecular Genetics*, 2012, Vol. 21, No. 15 3461-3473
- 59 Ramos E, Latourelle J, Lee J, Gillis T, Mysore J, Squitieri F, Di Pardo A, Di Donato S, Hayden M, Morrison P, Nance M, Ross C, Margolis R, Gomez-Tortosa E, Ayuso C, Suchowersky O, Trent R, McCusker E, Novelletto A, Frontali M, Jones R, Ashizawa T, Frank S, Saint-Hilaire M H, Hersch S, Rosas H, Lucente D, Harrison M, Zanko A, Marder K, Gusella J, Lee J, Alonso I, Sequeiros J, Myers R, MacDonald M, "Population stratification may bias analysis of PGC-1 as a modifier of age at Huntington disease motor onset" *Hum Genet* 2012 131:1833-1840
- 60 Lin-yan Wu L, Zhou , Huntingtin associated protein 1 and its functions *Cell Adhesion & Migration* 3:1, 71-76, January/February/March 2009.
- 61 Metzger S, Rong J, Nguyen HP, Cape A, Tomiuk J, A Soehn A, Propping P, Freudenberg-Hua Y, Freudenberg J, Tong L, Li SH, Li XL, Riess O, "Huntingtin-associated protein-1 is a modifier of the age-at-onset of Huntington's disease" *Human Molecular Genetics*, 2008, Vol. 17, No. 8 1137-1146
- 62 Kremer B, Goldberg P, Andrew S, Theilmann J, Tellenius H, Zeisler J, Squitieri F, Ling B, Bassett A, Almquist E, Bird T, Hayden M, "A Worldwide study of the Huntington's Disease Mutation" *The New England Journal of Medicine*. Vol 330 N° 20 Mayo 19, 1994
- 63 Andrew S, Goldberg Y, Kremer B, Tellenius H, Theilmann J, Adam S, et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; 4: 398-403
- 64 Sánchez A, Castellvi-Bel S, Mila M, Genis D, Calopa M, Jiménez D, et al. Huntington's disease: confirmation of diagnosis and presymptomatic testing in Spanish families by genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 625-7.
- 65 Alonso M, Yescas P, Cisneros B, Martínez C, Silva G, Ochoa A, et al. Analysis of the (CAG)<sub>n</sub> repeat causing Huntington's disease in a Mexican population. *Clin Genet* 1997; 51: 225-30.
- 66 Lima e Silva T, Guerra H, Bertuzzo C, Lopes I. Molecular diagnosis of Huntington disease in Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; 58: 11-7.

---

67 Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories Molecular Subcommittee of the Laboratory QA Committee by the Huntington Disease (HD) Working Group Edition 2006

68 Langbehn DR, Brinkman RR, Falush D, Paulsen JS, Hayden MR, “ A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington’s disease based on CAG length.”Clin Genet 2004; 65: 267–277.

69 Gusella J, MacDonald M, "Huntington’s disease: the case for genetic modifiers"Review Genome Medicine 2009, 1:80