

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCION DEL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**“Determinación del número de trietas CAG del gen IT15, en individuos
con antecedentes familiares de la enfermedad de Huntington atendidos
en diferentes unidades operativas de salud pública del Ecuador, en el año
2012.”**

JOSÉ FABRICIO PAREDES CORRALES

DIRECTOR: DR. SANTIAGO ESCALANTE

QUITO, FEBRERO 2014

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, JOSÉ FABRICIO PAREDES CORRALES, C.I. 0503576670, autor del trabajo de graduación intitulado: “DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TRIPLETAS CAG DEL GEN IT15, EN INDIVIDUOS CON ANTECEDENTES FAMILIARES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON ATENDIDOS EN DIFERENTES UNIDADES OPERATIVAS DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR, EN EL AÑO 2012” previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN BIOANÁLISIS CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

JOSÉ FABRICIO PAREDES CORRALES,
C.I. 0503576670

DEDICATORIA

A Dios
A Mi familia
A mis amigos
A la PUCE

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo debo agradecerle en primer lugar a ti Dios, por bendecirme durante toda mi vida, guiarme en mi vida universitaria, darme apoyo en los momentos más difíciles y sobre todo por haberme dado otra oportunidad de aprovechar la vida, espero ser digno de merecer esa segunda oportunidad y te agradezco por ayudarme a concluir este trabajo.

Quiero agradecerle a mi familia, mi padre y madre por siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por el esfuerzo que han hecho durante toda mi vida y ser el ejemplo a seguir de humildad y trabajo duro , le agradezco con un cariño inmenso a mi hermana Johanna ya que en toda la vida universitaria siempre me ha servido de ejemplo, me ha brindado su ayuda y gracias por haber compartido toda mi vida universitaria contigo, a mi hermano que siempre me motivaba a darle un ejemplo a seguir, quiero agradecerles a ustedes todo su apoyo incondicional.

Quiero agradecerle al Dr. Santiago Escalante mi director de tesis por siempre ayudarme, guiarme y agradecerle el hecho que siempre obtuve un apoyo incondicional de su parte.

Quiero también agradecer a todos los profesores que supieron transmitir su conocimiento hacia mi durante mi carrera profesional, aprendí algo importante de cada uno de ellos, de manera especial quiero agradecer a la Máster Sandra Andrade por guiarme en esta vida universitaria, por confiar siempre en mí y brindarme su amistad.

Agradezco a cada uno de los estudiantes con los que compartí experiencias en un aula de la Escuela de Bioanálisis, de manera especial a mis amigos Katty, Pancho, Fumanchu, Kary, Paola, Gabo, Álvaro, Milena, Carito, Salo y Lesly muchas gracias por todas esas anécdotas, experiencias, risas, llantos, gracias por estar conmigo en todo este proceso y brindarme su amistad.

Contenido

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE IMÁGENES	viii
LISTA DE SIGLAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
1.1. JUSTIFICACIÓN	3
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.3. OBJETIVOS	7
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	7
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
CAPÍTULO II.....	8
MARCO TEÓRICO	8
2.1 . ANTECEDENTES	8
2.2. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	9
2.2.1. ASPECTOS CLÍNICOS.....	10
2.2.2. FISIOPATOGENIA	11
2.2.3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO	16
2.2.4 MARCO CONCEPTUAL.....	19
2.2.3.1. Corea.....	19
2.2.3.2. Mutaciones dinámicas.....	19
2.2.3.3. Enfermedad de Huntington.....	20
2.2.3.4. Núcleo caudado y lenticular.....	21
2.2.3.5. Gen IT15- Huntingtina.....	21
2.2.3.6. Proteosoma.....	21
2.2.3.7. UPS (Sistema Ubiquitina Proteosoma).....	22
CAPÍTULO III	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. TIPO DE ESTUDIO	23
3.2. POBLACIÓN-AMBIENTE-PERIODO.....	23

3.3.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	24
3.4.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	24
3.5.	METODOLOGÍA DEL ESTUDIO	25
3.6.	TAMAÑO DE LA MUESTRA	25
3.7.	EQUIPOS Y MATERIALES	26
3.8.	TÉCNICAS EMPLEADAS	27
3.8.1.	EXTRACCIÓN SANGRE PERIFÉRICA	27
3.8.2.	PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE TOTAL.....	28
3.8.3.	CUANTIFICACIÓN DE ADN	30
3.8.4.	ELECCIÓN DE PRIMERS	30
3.8.5.	ALINEAMIENTO DE PRIMERS	31
3.8.6.	PREPARACIÓN DE LOS PRIMERS.	33
3.8.7.	PREPARACIÓN DE MIX	34
3.8.8.	PROTOCOLO DE PCR	35
3.8.9.	ELECCIÓN DE GEL DE AGAROSA.....	36
3.8.10.	ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICONES EN EL GEL.....	38
3.9.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	39
3.10.	CONTROL DE CALIDAD.....	40
3.11.	ASPECTOS ÉTICOS	40
CAPÍTULO IV		42
RESULTADOS		42
4.1.	CUANTIFICACIÓN DE ADN	42
4.2.	ÁRBOLES GENEALÓGICOS	46
4.3.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	53
DISCUSIÓN		59
CONCLUSIONES		63
RECOMENDACIONES.....		65
ANEXOS		67
BIBLIOGRAFÍA		75

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1 Enfermedades autosómicas dominantes causantes de corea.

Tabla N°2 Enfermedades autosómicas recesivas ligadas a x causantes de corea.

Tabla N°3 Cantidades elementos Go Taq Flexi buffer según casa comercial.

Tabla N°4 Cantidades elementos Go Taq Flexi buffer usados en el proyecto.

Tabla N°5 Protocolo de PCR del estudio.

Tabla N°6 Operacionalización de las variables.

Tabla N°7 Cantidad media de ADN en muestras extraídas.

Tabla N°8 Cantidades de ADN en las muestras de los pacientes participantes en el estudio.

Tabla N°9 Resultados luego de la amplificación del gen IT15.

Tabla N°10 Número aproximado de repeticiones CAG en los pacientes con enfermedad de Huntington.

Tabla N°11 Resultados de regresión en pacientes dudosos.

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1: *Primers en el programa Primer Blast.*

Imagen 2: *Secuencia Gen IT15 no delimitado por Primers.*

Imagen 3: *Secuencia Gen IT15 delimitado por Primers Forward y Reverse.*

Imagen 4: *PCR de gradiente.*

Imagen 5: *Cuantificación de ADN en los pacientes del estudio.*

Imagen 6: *Detalle simbología de árboles genealógicos.*

Imagen 7: *Árbol genealógico de familia 1.*

Imagen 8: *Árbol genealógico de familia 2.*

Imagen 9: *Árbol genealógico de familia 3.*

Imagen 10: *Árbol genealógico de familia 4.*

Imagen 11: *Árbol genealógico de familia 5.*

Imagen 12: *Electroforesis en geles de agarosa de los pacientes del estudio, Gel 1.*

Imagen 13: *Electroforesis en geles de agarosa de los pacientes del estudio, Gel 2.*

Imagen 14: *Electroforesis en geles de agarosa de los pacientes del estudio, Gel 3.*

Imagen 15: *Electroforesis en geles de agarosa de los pacientes que poseen una expansión en el gen.*

Imagen 16: *Electroforesis en geles de agarosa de los pacientes que poseen la Enfermedad de Huntington.*

Imagen 17: *Regresión exponencial para determinar el número de tripletas CAG.*

Imagen 18: *Electroforesis en geles de agarosa de los pacientes dudosos.*

LISTA DE SIGLAS

EH: *Enfermedad de Huntington.*

PCR: *Reacción en cadena de la polimerasa.*

CAG: *Trinucleótido Citocina, Adenina, Guanina.*

HTT: *Huntingtina.*

MHTT: *Huntingtina mutada.*

HSP: *Proteína de choque térmico.*

ADN: *Ácido Desoxirribonucleico.*

ARN: *Ácido Ribonucleico.*

DNAJ: *Proteínas de dominio J.*

SPECT: *Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales.*

ERO: *Especies reactivas de oxígeno.*

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado de primers proporcionado por GUSTAVO VENEGAS REPRESENTACIONES.

Anexo 2: Inserto de técnica Go Taq® Flexi DNA de la casa comercial Promega.

Anexo 3: Formato oficios enviados a instituciones participantes en el estudio.

Anexo 4: Consentimiento Informado.

RESUMEN

Introducción: La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del Sistema Nervioso Central que produce principalmente 3 tipos de desórdenes: alteración en los movimientos, desórdenes cognitivos y desórdenes emocionales. La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es de 5-10 por cada 100.000 habitantes.

La EH es un trastorno genético autosómico dominante producido por un aumento en el número de la tripleta CAG (glutamina) en el exón 1 del gen IT15 (HD), que codifica para una proteína citoplasmática llamada huntingtina.

La huntingtina posee un segmento de poliglutaminas “poliQ” a partir del residuo 17, seguido de un segmento de repeticiones de prolina cerca del extremo N-terminal. El segmento de poli Q, puede contener de 9 a 36 repeticiones de CAG en personas que no poseen la enfermedad y mayor a 36 repeticiones en aquellos que manifiesta la enfermedad.

Materiales y métodos: Se trabajó con 57 personas, correspondientes a 5 familias, en las cuales un ancestro de la familia fue diagnosticado con la patología. Se aisló ADN a partir de sangre total y se amplificó un fragmento del gen IT15 mediante el diseño de primers específicos. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 3% y se analizaron en el software ImageJ.

Resultados: Se pudo determinar que los pacientes C, E1, E, P, Q, K, Z, W, Y, X, H5, H8 tienen la EH, ya que poseen un alelo normal (menor a 36 repeticiones CAG), y un alelo expandido (mayor a 36 repeticiones CAG). De los 12 pacientes que presentaron la patología, uno padecía EH juvenil.

ABSTRACT

Introduction: Huntington's Disease is a progressive neurodegenerative disease of the Central Nervous System that occurs mainly with three types of disorders: movement, cognitive and emotional. The worldwide prevalence of the disease is 5-10 per 100,000 inhabitants.

HD is an autosomal dominant genetic disorder produced by an increased number of CAG trinucleotide (glutamin) in the IT15 gene (HD), exon 1, which encoded a cytoplasmic protein called huntingtin.

The huntingtin protein has a polyglutamine segment "polyQ" from residue 17, followed by a proline repeats segment near the N-terminal extreme. The poly Q segment may contain between 9 and 36 CAG repeats in healthy people and more than 36 repetitions in those who have the disease.

Materials and methods: We worked with 57 individuals, from five families in which an ancestor of the family was diagnosed with the disease. DNA was isolated from whole blood and a IT15 gen fragment was amplified throughout a specific primer design. The results was visualized in 3% agarose gel and then analyzed with ImageJ Software.

Results: We concluded that patients C, E1, E, P, Q, K, Z, W, Y, X, H5, H8 have HD, due to have a normal allele (less than 36 CAG repeats), and one expanded allele (greater than 36 CAG repeats). Only one patient had juvenile HD from the 12 patients who had the disease in this study.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Huntington HD, es una enfermedad Neurodegenerativa, que afecta al sistema nerviosa central, afectando a determinadas áreas del cerebro como la corteza cerebral y el estriado “Putamen y núcleo caudado”, su origen es genético (Christopher A. Ross, 2002), el gen causante se hereda de forma autosómica dominante, fue identificado por primera vez por J. Gusella en 1993. El gen llamado IT15, o gen HD, se localiza en el cromosoma 4p16.3, entre los marcadores D4S127 y D4S180 (Christopher A. Ross, 2002). Esta patología afecta de 5 a 10 individuos por cada 100.000 habitantes (I & Sharon R, 2010).

En individuos normales, el gen contiene un segmento con repeticiones Citosina-Adenina-Guanina (CAG) de 9 a 35 repeticiones, en pacientes con la enfermedad tienen una expansión anormal del triplete de bases (CAG), la mutación causante de la enfermedad produce una expansión del triplete de bases (CAG), en pacientes con la enfermedad la repetición de las bases supera las 36 repeticiones (Benítez-Barrueco, 2002).

El gen codifica un polipéptido de 3.144 aminoácidos con un peso molecular estimado en 348 kD, y se la denomina huntingtina htt (Iván Peñuelasa C. d., 1997).

Esta proteína se expresa en muchos tejidos, aunque la muerte celular en enfermedad de Huntington se restringe a neuronas específicas de regiones cerebrales concretas “corteza cerebral y el estriado”.

Estas proteínas defectuosas o mutadas originan la formación de cuerpos de inclusión y agregados amiloideos insolubles en el citoplasma y/o en el núcleo de las neuronas afectadas originando de distinta manera la neurodegeneración.

El objetivo de este estudio consistió en determinar la mutación que existe en el gen IT15 en los individuos participantes del mismo, mediante el uso de técnicas de biología molecular, con

el fin de conocer como se está expresando el gen en dichos individuos así como determinar un número aproximado del de repeticiones del trinucleótido CAG, esta investigación es una de las pionera en el tema y servirá para que en un futuro se inicien investigaciones similares relacionadas con la mencionada patología.

CAPITULO I

1.1. JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador, se está iniciando el estudio genético molecular de enfermedades neurodegenerativas, por lo cual no existe ningún antecedente de estudios relacionados con la enfermedad de Huntington (EH) que se caracteriza por presentar una serie de movimientos anormales involuntarios comúnmente llamado corea. La presente investigación es pionera a nivel nacional; es necesario indicar que los resultados encontrados por el grupo de investigación de Paz y Miño C, y col. 2012, en estudios similares de neuropatologías, han sido un esfuerzo para establecer evidencias que sugieren que a nivel de genética molecular se encuentran las mutaciones en los genes de mencionadas enfermedades en la población del Ecuador; y por otro lado ayudará al diagnóstico certero de la enfermedad de Huntington y otras enfermedades neurodegenerativas.

Cabe indicar que las muestras obtenidas, se analizarán con técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa “PCR”, con lo cual se obtendrán resultados concisos que soporten al diagnóstico clínico de la patología, de esta manera el médico sabrá con certeza que se trata de un paciente con EH, por consiguiente el tratante sabrá proporcionar un mejor manejo clínico de sus pacientes, iniciando un tratamiento para mejorar la calidad de vida del paciente, es decir calmar los movimientos involuntarios. En pacientes que ya tienen un diagnóstico clínico de la enfermedad de EH, se corroborará con las evidencias moleculares de la patología.

A través de esta investigación se pretende determinar el número de tripletas CAG en el exón 1 del gen IT15, que estén presentes en individuos con antecedentes familiares de la enfermedad de Huntington y que hayan sido atendidos en diferentes unidades operativas de salud pública del Ecuador en el año 2012. Cabe indicar que los individuos analizados podrían pertenecer a familias cuyos miembros podrían tener alto riesgo de desarrollar esta la neuropatología.

Es muy importante el diagnóstico genético-molecular de esta enfermedad autosómica dominante; ya que la descendencia de los pacientes diagnosticados tendría hasta un 50% de posibilidad de presentar la enfermedad en una edad igual o mayor a 35 años (J.C. Arango-Lasprilla, 2003). Cabe recalcar que la edad típica de aparición es entre los 35 y 40 años, aunque es posible su inicio a cualquier edad, en el 10% de los casos se produce la aparición antes de la segunda década de la vida, un 5% antes de los 14 años y un 1% antes de los 10 años. (Molón, Sáez, & Alcocer, 2010).

Por otro lado podemos puntualizar que la prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial es de 5 a 10 afectados por cada 100.000 habitantes (I & Sharon R, 2010) (J.A.Burguera, 1997).

La contribución potencial para la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, es incursionar en esta área de pesquisa para desarrollar proyectos de investigación básica relacionados con estas enfermedades neurodegenerativas que aumentan conforme se prolonga la esperanza de vida del ser humano.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Huntington o Corea de Huntington, fue descrita por primera vez en 1872, por el Dr. George Huntington, un médico que había observado a una familia de Long Island, Nueva York, debido a que presentaban una serie de movimientos descoordinados (George Huntington, 1872)(Ersoy, 2007) (Thompson, 2008).

Esta patología es una enfermedad neurodegenerativa, ya que produce una degeneración en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen) ocasionando una apoptosis neuronal, debido al aumento del trinucleótido citosina adenina guanina (CAG), en el exón 1 del gen IT15 (Leite, 2001).

En Ecuador no existe ningún tipo de estudio publicado sobre esta enfermedad. Esta investigación representa un esfuerzo para establecer un diagnóstico genético molecular de la Enfermedad de Huntington (EH), y a la vez iniciar una serie de investigaciones futuras relacionadas con la mencionada patología. Al ser esta una enfermedad neurodegenerativa, progresiva y con un final trágico y devastador, es necesario identificar y conocer la realidad genética de la población ecuatoriana que porta la mutación, para que el médico clínico inicie el tratamiento disponible para mejorar la calidad de vida del paciente, así como apoyar con un asesoramiento psicológico para los familiares del paciente, así mismo es indispensable implementar métodos diagnósticos confirmatorios por laboratorio como apoyo al proceso del diagnóstico clínico diferencial, ya que muchas veces los síntomas de esta enfermedad se pueden confundir con otras patologías, por ejemplo con Parkinson, Alzheimer y otros tipos de Coreas. En los pacientes que aún no inicien con la sintomatología, pero presenten una expansión en el exón 1 del gen IT15 servirá para dar un asesoramiento psicológico a los familiares del paciente.

El diagnóstico que realizan los neurólogos es un diagnóstico clínico con un criterio de evaluación de signos y síntomas, basado en exámenes de imágenes junto con el análisis de movimientos involuntarios, trastornos emocionales y antecedentes familiares.

Debido al costo que implica un diagnóstico genético molecular no todas las personas tienen acceso a esta prueba por eso es necesario indicar que muchas veces los síntomas de dicha patología se confunden con otras enfermedades que presentan movimientos similares como Parkinson y otro tipo de Coreas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la mutación en el exón 1 del gen IT15 en los individuos con antecedentes familiares de la Enfermedad de Huntington, atendidos en diferentes unidades operativas de salud pública del Ecuador, en el año 2012.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de la mutación en el exón 1 del gen IT15.
- Establecer la frecuencia del desorden autosómico dominante de la Corea de Huntington en los participantes de este estudio.
- Analizar y correlacionar los hallazgos clínicos con los resultados obtenidos de la investigación.
- Establecer el número aproximado de repeticiones de las tripletas CAG en los pacientes participantes en el estudio.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

La Corea de Huntington es una patología que produce principalmente 3 tipos de desórdenes, los cuales son: alteración en los movimientos, desórdenes cognitivos y desórdenes emocionales. En 1872, el Doctor George Huntington en su artículo titulado “On Chorea”, dio la primera descripción de la enfermedad de Huntington (Ersoy, 2007) (George Huntington, 1872). Dicho investigador realizó su estudio en un árbol genealógico norteamericano de ascendencia inglesa (Thompson, 2008). Con lo cual planteó 3 conclusiones: la primera fue que se trataba de una enfermedad de origen hereditario, la segunda conclusión a la que llegó fue que aquellos individuos que padecían la enfermedad tenían tendencias suicidas acompañadas de demencia y por último que la enfermedad se manifestaba siendo adulto y la condición se agravaba con la edad (George Huntington, 1872).

A partir de ese momento, se han realizado un sinnúmero de estudios para determinar las causas de aparición de esta enfermedad, el gen causante, la prevalencia, la clínica de la enfermedad, posibles tratamientos, y uno muy importante es la relación que existe entre la repetición del número de tripletas CAG y la edad de aparición de la enfermedad.

Un estudio realizado en la región Grampian en Escocia, demuestra que existe una correlación negativa entre el número de repeticiones de tripletas CAG y la edad de inicio de la enfermedad de Huntington, es decir, que cuanto mayor sea el número de repeticiones, más temprano aparece la enfermedad (Sheila A Simpson, 1993). Otra investigación similar realizada en Costa Rica corroboró dicha correlación (Melissa Vásquez-Cerdas, 2008), existen otros factores aún no esclarecidos que intervienen en la edad de aparición de la enfermedad (Sheila A Simpson, 1993). Es necesario mencionar que la prevalencia de esta patología es más elevada en las costas del lago Maracaibo en el estado de Zulia en Venezuela, la alta prevalencia se puede deber a un suceso evolutivo llamado efecto fundador (Irene Paradisi, 2007) (Wexler et al., 2004).

Los linajes venezolanos comprenden 18.149 individuos que abarcan 10 generaciones, que han sido estudiadas durante muchos años en distintos temas (Wexler et al., 2004).

2.2. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington, es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva del sistema nervioso central, afectando a determinadas áreas del cerebro, en donde las neuronas se degeneran y se produce la muerte celular programada. Este desorden es un trastorno genético producido por una mutación dinámica que se debe a un aumento en número de tripletas CAG en el exón 1 del gen IT15 o HD el cual codifica una proteína citoplasmática llamada huntingtina "htt"; que está localizado en el cromosoma 4p16.3 Existen varias hipótesis que tienden a explicar la muerte neuronal en la EH, como son la disminución del metabolismo energético, alteraciones de la función mitocondrial, estrés oxidativo y neurotoxicidad (Leite, 2001) (I. Tasset, 2009) (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004).

2.2.1. ASPECTOS CLÍNICOS

La clínica sintomatológica de los pacientes con la enfermedad de Huntington se basa en tres principales grupos de síntomas, como son: los cambios físicos o motores, cognitivos y emocionales los cuales se desarrollan gradualmente (Christopher A. Ross, 2002) (Hughes, Donald C. Lo and Robert E., 2010).

2.2.1.1. Cambios físicos o motores

Estos cambios principalmente se presentan de dos tipos de movimientos: los involuntarios anormales y los voluntarios. Entre la variedad de movimientos que sufren estos pacientes, el movimiento clásico es la corea, proviene de la palabra griega que significa “baile”, la severidad de la corea progresa según el grado de enfermedad.

La distonía, es la contracción involuntaria de los músculos, la torpeza, lentitud de movimientos, movimientos oculares anormales, falta de coordinación, rigidez y alteraciones al andar son muchos de los trastornos que presentan personas con EH.

2.2.1.2. Desórdenes cognitivos

Este tipo de trastornos generalmente inician al mismo tiempo que los movimientos anormales, aunque algunos pacientes pueden tener un considerable daño motor con una disminución del daño cognitivo. Los pacientes con EH, parecen tener problemas en la recuperación de recuerdos, mas no en el almacenamiento de recuerdos como sucede en el enfermedad de Alzheimer.

2.2.1.3. Desórdenes emocionales

Este tipo de desórdenes pueden ser los más molestos para el paciente, la familia y el tratante. Estos trastornos van desde depresión, conductas obsesivo-compulsivas, apatía, irritabilidad, conducta delirante y en raras ocasiones también alucinaciones (Christopher A. Ross, 2002).

Algo muy importante es que en los pacientes con EH, la tasa de suicidios es elevada (Hughes., 2010). Muchos años atrás el Dr. George Huntington en su artículo había llegado a esa conclusión (George Huntington, 1872).

2.2.2. FISIOPATOGENIA

La EH es una enfermedad que se produce por mutaciones caracterizadas por el aumento del número de repeticiones de tripletas CAG en el gen IT15. La tripleta CAG codifica el aminoácido glutamina. El gen IT15 codifica la proteína huntingtina (Leite, 2001) (Group, 1993). Esta proteína posee un segmento de poliglutaminas “poliQ”, a partir del residuo 17, seguido de un segmento de repeticiones de prolina cerca del extremo N-terminal (Cattaneo E, 2005) (Hughes, Donald C. Lo and Robert E., 2010). El segmento de poli Q, puede contener de 9 a 36 repeticiones de CAG; en función a ello, la proteína presenta un tamaño de alrededor de 3136 aminoácidos con un peso molecular de 348 kDa (I. Tasset, 2009).

2.2.2.1. Huntingtina

La htt, está presente en el núcleo, cuerpo celular, dendritas, terminales nerviosas de las neuronas y también se encuentra en algunos organelos como son aparato del Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias. (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004).

En diferentes estudios se han puesto en manifiesto las distintas funciones que se le atribuye a la htt:

- Participación en el desarrollo embrionario de vertebrados.
- Comunicación interneuronal

- Regulación transcripcional.
- Transporte intracelular “Complejo dinactina”
- Papel prosupervivencia.”Protege de apoptosis por estrés”

La htt en condiciones normales contiene de 9 a 36 repeticiones CAG, mientras que la forma mutada (mhtt) contiene más de 36 repeticiones de tripletas CAG (Christopher A. Ross, 2002) (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004). La mhtt altera la transcripción de genes y esto se debe a la formación de agregados intracelulares o por el secuestro de importantes factores de transcripción. La htt interviene en la regulación transcripcional, plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004).

2.2.2.2. Regulación transcripcional

La transcripción de ADN en ARN, es uno de los procesos más controlados en la célula, la expresión de genes que codifican para proteínas está regulada de un modo muy elaborado mediante los promotores, la presencia de secuencias regulatorias potenciadoras (“enhancers”) y la interacción entre múltiples proteínas activadoras o inhibitoras que actúan mediante su unión a secuencias específicas de reconocimiento al ADN (UNNE, 2010).

Es evidente que la htt tiene un rol importante en la transcripción y una variedad de métodos han demostrado que la htt y la mhtt interactúan con muchos factores de transcripción es decir proteínas que intervienen en la transcripción de ADN como son CREB, “cAMP response element-binding”, REST· R1-silencing transcription factor” , TAF II 130 “activation of a fuction of transcription 130 ”, TATA “Box TATA”.

Análisis en microarrays (chip de ADN) han demostrado que una serie de vías de transcripción se ven afectadas en esta patología (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004).

2.2.2.3. Chaperonas y el proteosoma

Dentro de las células las proteínas son continuamente degradadas en aminoácidos y a esa misma velocidad son remplazadas por proteínas recién sintetizadas (Bioquibi, 2010).

Varias chaperonas moleculares se encargan del correcto plegamiento de las proteínas recién sintetizadas, pero muchas veces este proceso puede ser infructuoso; así las proteínas deben ser replegadas correctamente o a su vez pueden ser degradadas por el sistema Ubiquitina-Proteosoma “UPS”. Las principales chaperonas que cooperan para facilitar el proceso de plegado y conformación de polipéptidos en forma soluble son la Hsp70 y Hsp40. La agregación es una característica de las proteínas anormalmente dobladas, razón por la cual si la producción de estas proteínas excede la capacidad de degradación de la célula, estos polipéptidos pueden formar agregados intracelulares insolubles. El UPS es el encargado de impedir la agregación, pero en ocasiones cuando no son capaces de hacer frente a la tasa de producción de la proteína mal plegada, se forman dichos agregados (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004).

2.2.2.4. Plegamiento alterado de la proteína

Htt al igual que otras proteínas poliQ, interactúan con la familia de chaperonas Hsp 70 y Hsp 40, en donde se ha encontrado agregados celulares en modelos animales con la enfermedad poliQ, por lo que esto sugeriría que el deterioro del plegamiento de la proteína induce la enfermedad de Huntington (Bates G, 2003). Lo que se define como un plegamiento alterado de la proteína. La inhabilitación de las chaperonas en los agregados, disminuye la cantidad de chaperonas que se encuentran disponibles en la célula, aumentando de esta manera el número de proteínas con esta alteración de plegamiento.

Hay evidencias que sugieren que solo ciertas subclases específicas de chaperonas afectan a la agregación de poliQ. Mediante un ensayo de interferencia de ARN (ARNi) en cepas de gusanos, Nollen y sus colegas lograron identificar solo dos Hsp70s “proteínas de choque

térmico y un miembro de las proteínas Dnaj “chaperonas de dominio J” que afectan la agregación en esta patología (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004).

2.2.2.5. Fallo del sistema ubiquitino-proteosómico.

Por otro lado si las chaperonas moleculares no son capaces de replegar correctamente las proteínas anormales, se induce su ubiquitinación (marcado de una proteína con ubiquitina) para dirigirse al proteosoma y su posterior degradación.

En la EH y otras enfermedades neurodegenerativas, se han encontrado inclusiones para ser ubiquitinizadas junto con varias subunidades del proteosoma, lo que sugiere un fallo en la maquinaria de degradación de la célula (Bates G, 2003), es decir trastornos en el sistema ubiquitina-proteosoma.

Varias evidencias han indicado que el deterioro en el UPS, es fundamental en la patogénesis de la enfermedad poliQ (Christian Landles & Gillian P.Bates, 2004). El proteosoma eucariota, es incapaz de digerir péptidos que contienen de 9-29Q residuos, razón por la cual estos péptidos deben ser degradados por una hidrólisis adicional por peptidasas no identificadas. Por lo tanto, el intento de degradación de los fragmentos patógenos poliQ, puede dar lugar a una agregación de fragmentos para salir del proteosoma, el fracaso de estas vías da lugar a la una mala función del proteosoma. La htt causa una inhibición de los UPS, y la agregación de proteínas perjudica directamente la función del UPS.

2.2.2.6. Alteraciones del metabolismo energético y de la función mitocondrial

El cerebro consume alrededor del 20% del oxígeno circulante, en relación con su peso relativo 2%, debido a que las neuronas presentan una elevada actividad metabólica, estas obtienen la energía de manera casi exclusiva a partir del metabolismo aeróbico de la glucosa.

El proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial, en condiciones aeróbicas constituye la principal y más eficaz vía de síntesis de ATP, el cual consiste en el transporte de electrones a

través de una cadena de cinco complejos enzimáticos que se localizan en la membrana mitocondrial interna, que están interrelacionados mediante moléculas de la coenzima Q₁₀ o del citocromo c. Mediante este proceso se logra oxidar los equivalentes reductores (NADH y FADH₂) y canalizar el flujo de electrones hacia el aceptor final del hidrógeno, que es el oxígeno. La energía que se libera en estas reacciones es utilizada para bombear protones desde el interior de la matriz mitocondrial hacia el espacio inter-membrana, logrando así generar un gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna, cuya energía se emplea en la producción de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (Pi)(Rubio JC, 1998).

En EH existe un déficit del 55% en la actividad de los complejos mitocondriales II y III; y de un 25% del complejo IV, en el caudado y putamen. La falta del complejo II mitocondrial, se caracteriza por la disminución de la oxidación de los sustratos dependientes de FADH₂, como el succinato y en la oxidación normal de los dependientes de NADH, como el malato, mientras que el bloque del complejo III altera la oxidación en ambos. Sin embargo cualquier déficit enzimático que afecte a la cadena respiratoria, va a afectar de manera importante al metabolismo celular (Hughes., 2010).

Mediante la tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT) se evidencia que en EH, hay una disminución de la perfusión sanguínea cerebral, detectada incluso en los portadores presintomáticos de la mutación. Estudios realizados con tomografía por emisión de positrones de F-18 fluorodeoxiglucosa (FDG-PET) en pacientes con EH, revelan la disminución del patrón típico de la actividad metabólica cerebral (Leite, 2001).

2.2.2.7. Estrés oxidativo

La formación de radicales libres es responsable de cerca del 2% del consumo del oxígeno usado en la respiración. Estos radicales libres se generan en la mitocondria durante el transporte de electrones en la cadena de fosforilación oxidativa; estas especies reactivas de oxígeno “ERO”, pueden generar reacciones en cadena con moléculas de todas las estructuras celulares, ya sean proteínas, lípidos de membrana, ácidos nucleicos y alteran su función, este tipo de alteraciones se denominan estrés oxidativo. El principal blanco de ataque de las ERO,

es el ADN mitocondrial, debido a su localización en la matriz mitocondrial, a la falta de histonas y a su mecanismo de reparación limitados (Leite, 2001).

En pacientes con EH, existe un aumento en las deleciones del ADN mitocondrial en los lóbulos temporal y frontal de la corteza, así como un aumento de la concentración de 8-hidroxi-deoxiguanosina, un marcador de lesión oxidativa del ADN, en el caudado y en la corteza frontal (Leite, 2001).

2.2.3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico de la enfermedad de Huntington, se basa principalmente en el análisis de los síntomas clínicos y signos de una persona que tenga un padre comprobado con dicha patología. Es obligatorio tener un historial preciso del paciente junto con la sintomatología además de un historial familiar detallado; cuando se tiene toda esta información, el diagnóstico no es muy difícil, aunque existen algunos casos que presentan similar sintomatología y pueden ser engañosos; existen también casos en los que no se conoce al antecesor con dicha patología debido a que ha muerto a temprana edad por alguna otra causa, en estos casos el cuadro clínico puede ser difícil de reconocer, en dichos casos es muy importante solicitar información antigua de las historias clínicas y los informes de autopsia. El “gold standard” o prueba de oro es la determinación de ADN, para demostrar que el individuo presenta una repetición de CAG al menos de 36 repeticiones en gel de la huntingtina en el cromosoma 4.

Actualmente los criterios clínicos necesarios siguen siendo cambios motores, desórdenes cognitivo y emocionales, con la combinación del historia familiar, que es necesario para el diagnóstico de dicha patología (Roos, 2013).

En los casos en los que los movimientos coreicos son los más importantes, es de vital importancia el diagnóstico diferencial, ya que la EH comparte dichos movimientos con otras enfermedades que pueden tener orígenes de tipo hereditario, reumático e inducido por drogas.

En aproximadamente el 1% de los casos que son diagnosticados como EH por el clínico, la prueba genética no confirma su diagnóstico. Estos son los llamados fenocopias de la enfermedad de Huntington. Una fenocopia es un síndrome fenotípicamente característico de un genotipo determinado, pero producido por causas que no tienen un origen genético. En las fenocopias de la EH, poseen un síndrome fenotípicamente simulador de la EH, pero es producido por cualquier otra causa diferente a la mutación genética que existe en el exón 1 del gen IT15, ya sea genético o no. En una revisión reciente realizada por Wild Ej y colaboradores, definieron que la fenocopia de la EH debe cumplir 3 criterios:

- Trastornos de movimientos compatibles con EH.
- Estudio genético negativo.
- Al menos unos de estos tres puntos:
 - Patrón familiar autosómico dominante
 - Deterioro cognitivo
 - Síntomas psiquiátricos.

Por lo tanto, pueden existir fenocopias con un patrón hereditario de tipo autosómico recesivo, o a su vez sin deterioro cognitivo o síntomas psiquiátricos; siempre y cuando el estudio genético para la enfermedad de Huntington sea negativo. A continuación se encuentra en las tabla 1 enfermedades autosómicas dominantes que producen corea, y en la tabla 2 enfermedades autosómicas recesivas que producen corea (García, 2011).

TABLA N°1 ENFERMEDADES AUTOSOMICAS DOMINANTES CAUSANTES DE COREA

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

*ADRPL: atrofia dentadorubropalidoluisiana; EH: enfermedad de Huntington; HDL: Huntington disease like; SCA; atrofia espinocerebelosa. ADCA-I: ataxia cerebelosa autosómica dominante tipo I: ataxia cerebelosa progresiva con oftalmoplejía, demencia, atrofia óptica, signos extrapiramidales, o amiotrofia (SCA1-4, SCA8, SCA12, SCA13, SCA17, SCA21, SCA27, SCA28). ADCA-II: Ataxia cerebelosa autosómica dominante tipo II: semiología superponible a ADCA-I + degeneración pigmentaria retina (SCA7). Las entidades ADCA-III cursan con ataxia pura de inicio tardío y no producen corea (SCA5, SCA6, SCA10, SCA11, SCA14-16, SCA19, SCA22, SCA25, SCA26).

(García, 2011)

TABLA N°2 ENFERMEDADES AUTOSOMICAS RECESIVAS LIGADAS A X CAUSANTE DE COREA

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

(García, 2011)

2.2.4 MARCO CONCEPTUAL

2.2.3.1. Corea

La palabra corea proviene de la palabra griega Koreia, que significa danza: en estos pacientes su principal alteración son los movimientos incontrolados de las extremidades y todo el cuerpo en general y de esta manera podemos indicar que la corea tiene una serie de movimientos rápidos, bruscos, involuntarios y descoordinados sin un propósito; los cuales tienen una predominancia generalmente en la cara, lengua y miembros superiores con flexión de los dedos, abducción del brazo y gesticulaciones grotescas (Hernán Vélez A, 2002).

2.2.3.2. Mutaciones dinámicas

Las mutaciones dinámicas envuelven un grupo de mutaciones o alteraciones genéticas que han sido identificadas en los últimos años. Estas mutaciones consisten en un incremento del

número de repeticiones de un determinado trinucleótido que se asocia a un grupo de patologías neurológicas y/o neuromusculares concretas, en el caso de este estudio es el aumento del trinucleótido CAG que se evidencia en la enfermedad de Huntington. Estas mutaciones se caracterizan por presentar una inestabilidad inter e intrageneracional, y tienen la peculiar característica de presentar una relación inversamente proporcional entre el número de repeticiones y la edad de aparición de los primeros síntomas “anticipación genética” (Benítez, 1999).

2.2.3.3. Enfermedad de Huntington

“Se define como una enfermedad neurodegenerativa de naturaleza hereditaria familiar, de carácter autosómica dominante cuya expresión se encuentra en un gen del cromosoma 4”. Fue descrita inicialmente en el lago Maracaibo, Venezuela, y con algunos grupos familiares encontrados en Colombia, como el de Juan de Acosta “Atlántico” (Hernán Vélez A, 2002).

Las manifestaciones clínicas más importantes son motoras, movimientos coreicos y distónicos, parkinsonismo, incoordinación, disartria y ataxia. También presentan un síndrome demencial tipo subcortical, deterioro general progresivo y muerte en el transcurso de 10 a 15 años.

En la anatomía patológica se evidencia cambios atróficos microneuronales en el putamen, núcleo caudado, globos-palidus y tálamo con miosis reactiva. Existe una reducción importante en neurotransmisores como gaba-acetilcolina, sustancia P, encefalinas y colecistoquininas, mientras que también existen otras sustancias que se encuentran elevadas como son: dopamina, norepinefrina y péptido intestinal vasoactivo.

La edad característica de aparición de la patología es entre los 35 y 45 años, aunque es posible su inicio a cualquier edad. En el 10% de los casos la aparición de la patología se produce antes de los 20 años, un 5% antes de los 14 años y el 1% antes de los 10 años, la edad de aparición de la enfermedad varía dependiendo del número de tripletas CAG que posee cada individuo. En este subtipo juvenil se ha visto que el 70-80% de los casos la transmisión es paterna (Molón, Sáez, & Alcocer, 2010).

2.2.3.4. Núcleo caudado y lenticular

En conjunto, las 2 áreas cerebrales forman el cuerpo estriado. A su vez el cuerpo estriado se divide en el neostriado, compuesto por el núcleo caudado y putamen, y el paleostriado o globo pálido. La reunión del globo pálido y el putamen constituye el núcleo lenticular.

El núcleo caudado ocupa una posición característica en la pared lateral del ventrículo lateral y consta de 3 partes: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza del núcleo caudado forma un relieve evidente en el asa anterior de ventrículo lateral. Aproximadamente a nivel del agujero interventricular, el caudado disminuye de tamaño pero sigue en sentido caudal como cuerpo del núcleo caudado por la parte lateral del cuerpo del ventrículo lateral (Haines, 2003).

2.2.3.5. Gen IT15- Huntingtina

EL gen que muta en la enfermedad de Huntington es conocido como IT15 o también huntingtina, se encuentra en un extremo del cromosoma 4. Los genes son segmentos de la doble hélice del ADN, que codifican la información para la elaboración de proteínas. Este gen, incluso en gente normal, contiene una especie de tartamudeo molecular, pues en él se repite el triplete CAG entre 9 y 36 veces en su exón 1, mientras que en las personas que padecen la enfermedad se puede repetir hasta 250 veces (Leite, 2001).

2.2.3.6. Proteosoma

El proteosoma es un complejo macromolecular que se encuentra compuesto por múltiples subunidades proteicas, las que sirve para degradar proteínas de manera selectiva, entre otras funciones encontramos:

- Destrucción de proteínas malformadas
- Papel regulador como parte del sistema ubiquitina

- Diferenciación celular
- Sistema inmunológico (inmunoproteosoma)
- Regula el ciclo celular
- Ayuda a la defensa contra toxinas
- Se asocia a la hidrólisis de ATP
- Es una maquinaria degradativa de proteínas

2.2.3.7. UPS (Sistema Ubiquitina Proteosoma)

Es el sistema en el cual las proteínas son degradadas, consiste primeramente en el marcaje de las proteínas a ser eliminadas, son marcadas por una pequeña proteína llamada ubiquitina, luego de que las moléculas a eliminar se encuentren unidas a la ubiquitina, la enzima ubiquitina ligasa, es la encargada de agregar más proteínas de ubiquitina, dando como resultado la formación de una cadena poliubiquitinica que le permitirá posteriormente al proteosoma identificar y degradar la proteína. Por ende el proceso de ubiquitinización conjuntamente con el proceso de degradación proteosómica recibe el nombre de sistema ubiquitina-proteosómico.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación tiene un diseño transversal descriptivo, que se llevó a cabo con pacientes de distintos centros hospitalario públicos con un diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Huntington.

Esta investigación se llevó a cabo con un muestreo no probabilístico intencionado debido a varios factores: la muy baja prevalencia enfermedad, presupuesto limitado y al alto costo del procesamiento de las técnicas a ejecutar. La selección de pacientes se determinó tomando en cuenta a todos los pacientes con un diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Huntington y a sus familiares en riesgo.

3.2. POBLACIÓN-AMBIENTE-PERIODO

Población: Pacientes que tienen un diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Huntington y familiares de dichos pacientes que deseen participar en la investigación, se tomaron los pacientes de los siguientes hospitales:

- Hospital Pablo Arturo Suarez “Quito”
- Hospital de Especialidades Médicas Eugenio Espejo “Quito”
- Hospital Pediátrico Baca Ortiz “Quito”
- Hospital Carlos Andrade Marín “Quito”
- Hospital General Gustavo Domínguez “Santo Domingo de los Tsáchilas”

Muestras: Se recolectó una muestra sanguínea de sangre total en EDTA un total de 4ml de sangre por cada individuo participante de la investigación, realizando luego la extracción de ADN para amplificar la región de interés en el estudio mediante una PCR convencional.

Todo este proceso se lo realizó durante los meses de mayo a junio del 2012.

3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Se tomaron en cuenta todos los pacientes de los hospitales públicos seleccionados, con un diagnóstico presuntivo de la patología y a sus familiares.
- Se analizaron pacientes con cualquier edad, sin distinción de sexo.
- Participaron aquellos pacientes que firmaron el consentimiento informado, en el caso de menores de edad, la firma de sus representantes legales de aceptación de ingreso en el estudio.

3.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- No fueron tomados en cuenta los pacientes sin antecedentes de la patología.
- No fueron tomados en cuenta aquellos pacientes con diagnóstico de otras enfermedades neurodegenerativas.

3.5. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

-La primera etapa de la investigación consistió en recolectar las muestras de sangre en todas las instituciones de salud involucradas en el estudio.

-La segunda etapa consistió en el procesamiento de las muestras en el laboratorio de la escuela de Bioanálisis.

-La tercera etapa consistió en análisis de los resultados obtenidos.

3.6. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El presente estudio se trabajó con un muestreo no probabilístico intencionado debido a varios factores: la muy baja prevalencia enfermedad, presupuesto limitado y al alto costo del procesamiento de las técnicas a ejecutar.

Al tratarse de una investigación transversal descriptiva, para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N}{e^2(N - 1) + 1}$$

Donde:

n= tamaño de la muestra

N= Tamaño de la población en el tiempo

e= precisión o error admitido.

$$n = \frac{57}{(0,05)^2(57 - 1) + 1}$$

$$n = \frac{57}{1.14}$$

$$n = 50$$

En este estudio se usó la fórmula descrita anteriormente donde se estableció un nivel de confianza mayor al 95% con un $z = 2$; con un error de muestreo o precisión del 5%, obteniendo así una muestra de 50 pacientes.

Cabe recalcar que para esta fórmula se usó una población total de 57 pacientes que corresponden al número aproximado de individuos con riesgo de tener la patología en los hospitales en los que se va a realizar la investigación.

3.7. EQUIPOS Y MATERIALES

Los equipos que se utilizaron para el presente estudio, fueron los que se encontraban en el laboratorio de investigación de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, y fueron los siguientes:

- Fluorómetro Qubit® 2.0; Marca: INVITROGEN; Modelo: QUBIT 2.0; Ref. Q-32866; Serie: 1202005498.
- Termociclador; Marca: LABNET; Modelo: MULTIGENE OPTIMAX; Ref. TC-9610; Serie: 1202020.
- Transiluminador con luz ultravioleta; Marca: INVITROGEN; Modelo: BLUE-LIGHT TRANS-ILUMINATOR; Serie: 13110317.
- Microcentrífuga; Marca: LABNET; Modelo: C-2500; Ref. G-6600; Serie: P-101004.
- Cámara de flujo laminar; Marca: C.B.S SCIENTIFIC; Modelo: P-036202; Serie: 004000400.
- Termobloque; Marca: DRY-BATH; Modelo: DB-005; Serie: 919622.
- Cámara electroforética; Marca: C.B.S SCIENTIFIC; Modelo: MGU-502T; Serie: 006918.
- Cámara fotográfica; Marca: SONY; Modelo DSLR-A380
- Pipetas automáticas de volumen variable; Marca: LABNET

A continuación se detallan los materiales usados en este estudio:

- Termómetro temperatura variable
- Puntas para pipetas con filtro volumen 0.1-10ul; Marca: AXYGEN.
- Puntas para pipetas con filtro volumen 100ul; Marca: AXYGEN.
- Puntas para pipetas con filtro volumen 1000ul; Marca: AXYGEN.
- Microtubos volumen 1.5ml; Marca: AXYGEN.
- Microtubos PCR volumen 0.2ml; Marca: AXYGEN.
- Guantes de nitrilo; Marca: GESKIN.
- Galón de alcohol antiséptico (95%).
- Paquete de toallas de papel.
- Kit de extracción de ADN PURELINK; Marca: INVITROGEN.
- DNA Ladder 1000pb Trackit; Marca: INVITROGEN.
- 25bp DNA Step Ladder ; Marca: PROMEGA.
- DNA SYBRSafe-INVITROGEN.
- Agarosa 500 gramos (Ultra-Pure); Marca: INVITROGEN.
- Buffer TBE 10X-PROMEGA.
- Primers gen IT15(forward y reverse). Marca: PROMEGA.
- Primers Beta-actina (forward y reverse). Marca: PROMEGA.
- Go Taq® Flexi DNA polymerase. Marca PROMEGA

3.8. TÉCNICAS EMPLEADAS

Todas las técnicas empleadas se realizaron luego de que el paciente firmó el consentimiento informado, iniciando así la parte experimental del proyecto:

3.8.1. EXTRACCIÓN SANGRE PERIFÉRICA

Se recolectó 4 ml de las muestras sanguíneas mediante la técnica de sistema al vacío, con tubos que contenían como anticoagulante EDTA. Las muestras fueron tomadas siguiendo todas las medidas de bioseguridad pertinentes, el procedimiento que se siguió para la extracción fue el establecido para toma de muestras de sangre venosa periférica.

3.8.2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE TOTAL

Para la extracción de ADN de las muestras sanguíneas de sangre total, se usó el kit de extracción de ADN PURELINK de la casa comercial INVITROGEN, a partir de las siguientes indicaciones:

- Colocar en un tubo eppendorf estéril (1.5ml) 100 ul de solución PBS Y 100 ul de sangre total.
- Agregar 20 ul de PROTEINASA K al tubo.
- Agregar 20 ul RNAsa A al lisado, mezclar bien “vortex” e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
- Agregar 200 ul del reactivo “PURE-LINK GENOMIC LYSIS/BINDING BUFFER”, y mezclar bien “vortex” hasta obtener una solución homogénea.
- Incubar a 55°C por 10 minutos.
- Agregar 200 ul de etanol (96-100%) al lisado. Mezclar bien “vortex” por 5 segundos para obtener una solución homogénea.
- Proceder inmediatamente a la atadura del ADN.

ATADURA ADN

- Remover el PURELINK SPIN COLUMN en un tubo nuevo.
- Agregar el lisado preparado (aproximadamente 640 ul) con el PURELINK GENOMIC LYSIS /BINDING y ETANOL al PURELINK SPIN COLUMN.
- Centrifugar la columna a 10000 RPM durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar, y colocar el SPIN COLUMN en un PURELINK COLECTION TUBE limpio que viene suministrado en el kit.
- Proceder con el lavado del ADN.

LAVADO ADN

- Agregar 500 ul del BUFFER WASH 1 a la columna.
- Centrifugar la columna a 10000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar, y colocar el SPIN COLUMN en un PURELINK COLECTION TUBE limpio que viene suministrado en el kit.
- Agregar 500 ul del BUFFER WASH 2 a la columna
- Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el collection tube.
- Proceder con la elución del ADN

ELUCIÓN ADN.

- Colocar el SPIN COLUMN en un tubo eppendorf estéril de 1,5ml.
- Agregar 105 ul del PURELINK GENOMIC ELUTION BUFFER a la columna.
- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Para recubrir más DNA, desarrolle un segundo proceso de elución usando el mismo volumen del buffer de elución como primera elución en otro tubo eppendorf estéril de 1,5ml.
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.

Luego de todo este procedimiento obtuvimos 105 ul de ADN asilado; realizamos 10 alícuotas de 10 ul en tubos eppendorf de 0,2 ml; el ADN extraído fue almacenado en congelación a -20 grados centígrados.

3.8.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación de ADN extraído se realizó con el Qubit® ds-DNA HS Assay kit y la lectura con el fluorómetro Qubit®2.0. Para la cuantificación se debió seguir el procedimiento detallado a continuación:

- Preparar la solución mix, por cada cuantificación de ADN preparar 99,5 ul del Buffer más 0,5 ul del Fluorocromo.
- Se debe preparar 100 ul de la mix por cada muestra y standar a cuantificar.
- Para preparar los standars, colocar 95 ul de la solución mix, más 5ul de cada estándar.
- Para la preparación de cada muestra colocar 99,5 ul del mix más 0,5 ul de cada muestra.
- Todo esto colocar en tubos específicos de lectura para su posterior cuantificación en el equipo Qubit.
- Luego de realizar todo el procedimiento, incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- En el equipo leer primero los 2 standars y luego cada muestra.

3.8.4. ELECCIÓN DE PRIMERS

- Para la amplificación del exón 1 del gen IT15 en donde se encuentra la región de repetición de tripletas CAG se amplifico mediante los siguientes primers:
- IT15 forward 5': CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC
- IT15 reverse 5': GGCGGTGGCGGCTGTTG (Irene Paradisi, 2007)

Los datos de cada uno de los primers se verificaron en el programa PRIMER BLAST (IMAGEN 1) en la siguiente página en internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, aquí en esta página se ingresó el primer forward tanto como el reverse, al cabo de unos minutos se obtuvo la Tm de cada uno de los primers y también el fragmento que van a amplificar dichos primers.

Detailed primer reports						
Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC	23	62.24	56.52	5.00	2.00
Reverse primer	GGCGGTGGCGGCTGTTG	17	64.59	76.47	3.00	0.00
Products on target templates						
>NM_002111.6 Homo sapiens huntingtin (HTT), mRNA						
product length = 103						
Forward primer	1 CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC	23				
Template	174	196				
Reverse primer	1 GGCGGTGGCGGCTGTTG	17				
Template	276	260				

Imagen 1 "Primers de la EH verificados en el programa Primer Blast"

3.8.5. ALINEAMIENTO DE PRIMERS

- Los alineamientos se realizaron en el programa MEGA 5.0 siguiendo los siguientes pasos:

1.- Se seleccionó una secuencia del gen en donde se sabe que existen la repetición de tripletas CAG que estamos buscando. En este caso es el exón 1 del gen IT15, que se encuentra ubicado en el cromosoma 4p16.3, correspondiente a la siguiente secuencia, la referencia >gi|450395|gb|L27350.1|HUMHD01 Homo sapiens huntingtin (HD) gene, exon 1

```

TTGCTGTGTGAGGCAGAACCTGCGGGGGCAGGGGGCGGGCTGGTTCCTG
GCCAGCCATTGGCAGAGTCCGCAGGCTAGGGCTGTCAATCATGCTGGCC
GGCGTGGCCCCGCCTCCGCCGGCGCGGCCCCGCCTCCGCCGGCGCACGT
CTGGGACGCAAGGCGCCGTGGGGGCTGCCGGGACGGGTCCAAGATGGA
CGGCCGCTCAGGTTCTGCTTTTACCTGCGGCCAGAGCCCCATTATTGC
CCCGGTGCTGAGCGGCGCCGCGAGTCGGCCCCGAGGCCTCCGGGGACTGC
CGTGCCGGGCGGGAGACCGCCATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAAG
GCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC

```

AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGC
 CACCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCCTCAGCTTCCTCAGCCGCCGCC
 GCAGGCACAGCCGCTGCTGCCTCAGCCGCAGCCGCCCGCCGCCGCC
 CCGCCGCCACCCGGCCCGGCTGTGGCTGAGGAGCCGCTGCACCGACCGT
 GAGTTTGGGCCCCTGCAGCTCCCTGTC.

2.- Se debió ingresar al programa MEGA, y en el apartado BUILD ALIGNMENT creamos un nuevo alineamiento.

- Copiamos la secuencia del gen de referencia “ exón 1 del gen IT15”
- Copiamos la secuencia del primer forward “IT15 FORWARD”
- Copiamos la secuencia anticplementaria del primer reverse “IT15 REVERSE”

3.- Se debió buscar las secuencias de los primers en la secuencia de referencia, en este caso en la secuencia de exón 1 del gen IT15 (Imagen 2).

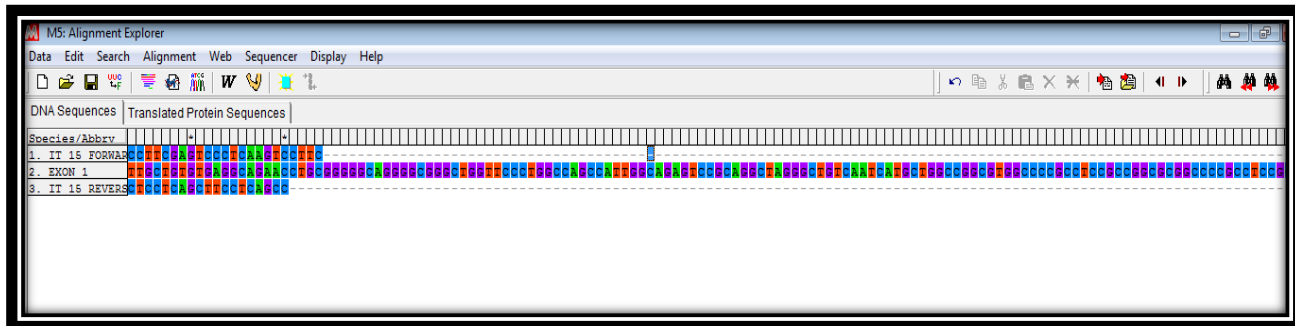


Imagen 2 “Imagen que muestra el exon 1 del gen IT15, junto con el primer forward y reverse”.

4. Eliminar el resto de la secuencia que no se va a amplificar, así se obtiene la secuencia que estamos buscando, en este caso el tamaño del amplicon es de 139 pares de bases (Imagen 3).

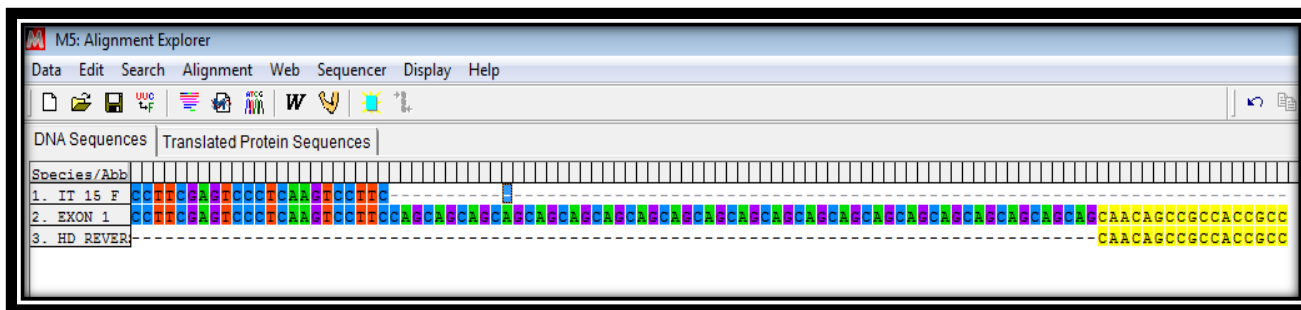


Imagen 3 “Imagen que indica el fragmento del gen IT15 a ser amplificada”

Luego de evidenciar que existe un correcto alineamiento de primers, se prosiguió a pedir los primers a través de la GUSTAVO VENEGAS REPRESENTACIONES (Anexo 1).

3.8.6. PREPARACIÓN DE LOS PRIMERS.

- El primer forward tiene de peso molecular 41,3 nmoles razón por la cual se debió pipetear 413 ul para obtener una concentración de 100 uM. Esta concentración nos servirá para tener una solución madre.

$$41,3 \text{ nmoles} \times \frac{1000 \text{ pmoles}}{1 \text{ nmol}} \times \frac{1 \text{ ul}}{100 \text{ pmol}} = 413 \text{ul}$$

- El primer reverse tiene un peso molecular de 35,3 nmoles razón por la cual se debió pipetear 353 ul para obtener una concentración madre de 100uM con un volumen de 353 ul.

$$35,3 \text{ nmoles} \times \frac{1000 \text{ pmoles}}{1 \text{ nmol}} \times \frac{1 \text{ ul}}{100 \text{ pmol}} = 353 \text{ul}$$

- Preparamos una solución de primers de trabajo con una concentración de 10uM, para esto pipeteamos en un tubo eppendorf pequeño 10 ul de la solución madre de concentración 100uM, y agregamos 90uL de agua ultrapura. Repetimos este procedimiento con cada uno de los primers.
- La fórmula con la que se realizó los cálculos pertinentes para realizar una solución de trabajo de 10uM, fue la siguiente:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$100 \text{ uM} \times V1 = 10 \text{ uM} \times 100\text{ul}$$

$$V1 = \frac{10 \text{ uM} \times 100 \text{ ul}}{100 \text{ uM}}$$

$$V1 = 10 \text{ uL}$$

Colocamos 10 ul de la solución madre y aforamos a 100 ul, para así obtener una concentración de 10 uM; esa fue la concentración de primers con la cual trabajamos posteriormente.

3.8.7. PREPARACIÓN DE MIX

- La preparación del mix, según la técnica de la casa comercial, (Anexo 2).

TABLA N°3 CANTIDADES ELEMENTOS GO TAQ FLEXI BUFFER SEGÚN CASA COMERCIAL.

Component	Final Volume	Final Conc.
5X Green or Colorless GoTaq® Flexi Buffer ¹	10µl	1X
MgCl ₂ Solution, 25mM ¹	2–8µl	1.0–4.0mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	1µl	0.2mM each dNTP
upstream primer	Xµl	0.1–1.0µM
downstream primer	Yµl	0.1–1.0µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0.25µl	1.25u
template DNA	<u>Zµl</u>	<0.5µg/50µl
Nuclease-Free Water to	50µl	

¹Thaw completely and vortex thoroughly prior to use.

- Se modificó de la siguiente manera el mix para obtener mejores resultados:

TABLA N°4 CANTIDADES ELEMENTOS GO TAQ FLEXI BUFFER USADOS EN EL PROYECTO.

Component	Final Volume	Final Conc.
5X Green or Colorless		
GoTaq® Flexi Buffer ¹	10µl	1X
MgCl ₂ Solution, 25mM ¹	4 µl	2,0 mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	1µl	0.2mM each dNTP
upstream primer	2 µl	0.4 µM
downstream primer	2 µl	0.4 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0.25µl	1.25u
template DNA	1,5 µl	<0.5µg/50µl
Nuclease-Free Water to	29,25 µl	

3.8.8. PROTOCOLO DE PCR

- Para la amplificación de la región que posee la repetición de tripletas CAG, se trabajó con Go Taq® Flexi DNA Polymerase, de la casa comercial PROMEGA, siguiendo el siguiente protocolo TABLAN N°5:

TABLA N°5 PROTOCOLO DE PCR DEL ESTUDIO.

PROTOCOLO DE PCR		
Denaturación inicial	94°C	3 minutos.
Denaturación	35 CICLOS	95°C, 30 seg.
Hibridación		62,5°C, 45 seg.
Elongación		72°C, 45 seg.
Elongación final	72°C	5 minutos.

- Se realizó una PCR de gradiente con las siguientes temperaturas de hibridación: 61,5°C, 62,5°C, 63°C, 63,5°C, 64°C y 65°C, con el fin de obtener la temperatura óptima de hibridación de los primers. Luego de esto se pudo evidenciar que la banda más clara se producía a una temperatura de 62,5°C (Imagen 4) , razón por la cual se escogió dicha temperatura para el protocolo de PCR.

- Alelo intermedio, de 27- 35 repeticiones, “No produce fenotipo” (Potter Nt, 2004).
- Un alelo expandido o mutado es cuando posee mayor de 36 repeticiones, generan un fenotipo de EH (Potter Nt, 2004).
- A partir de esta relación asumimos que el fragmento amplificado en pacientes que no poseen la enfermedad va a medir 148 pb, mientras que los pacientes que poseen la enfermedad, es decir, van a ir aumentando 3 pares de bases por cada repetición adicional.
- Conociendo ya el tamaño esperado del amplicon, se procedió a realizar un gel de agarosa al 3%, ya que se sabe que se debe usar un gel de alta concentración mientras el fragmento es más corto; si se tratase de un fragmento de mayor cantidad de pares de bases, la concentración del gel de agarosa debería ser menor.
- Se realizó geles de agarosa al 3%, con un volumen final de 90 ml, lo que quiere decir que se pesó 2,7gr de agarosa y se disolvió en 90 ml de TBE 1X.
- Colocar el TBE 1X junto con el agarosa en un recipiente de vidrio, llevarlo al microondas durante 2 minutos en potencia 3, una vez que se encuentre disuelto el agarosa pipetear 9 ul de SYBR safe, mezclar bien todo, finalmente se colocó 2 minutos más en potencia 3 en el microondas, obteniendo así una solución semilíquida de agarosa.
- Se colocó el agar en un molde que poseía dos peinetas, luego de 30 minutos se quitó las peinetas junto con el gel para su posterior electroforesis. Así se obtuvo un gel de agarosa al 3% con un total de 40 pocillos, 20 distribuidos en la parte superior del gel y 20 en la parte media del mismo.

- Se utilizó TBE 1X, debido a que es el buffer recomendado para la migración de amplicones menores a 1Kb.

3.8.10. ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICONES EN EL GEL

- Se obtuvo un gel de agarosa al 3% con 40 pocillos para la electroforesis, el largo de gel fue de 10 cm el ancho de 13 cm y el espesor de 0,8 cm. La distancia entre los 20 pocillos superiores y los 20 pocillos inferiores fue de 4 cm.
- En los 20 pocillos superiores se colocó los amplicones que poseen el aumento del trinucleótido CAG y en los 20 pocillos inferiores colocó amplicones de beta actina, que sirvieron como controles de extracción y amplificación de ADN.
- Luego de medir la distancia entre los 2 polos de la cámara de electroforesis que corresponde a una distancia de 19 cm, se decidió correr el gel a 80 voltios durante una hora con veinte minutos. Decidimos este voltaje, basándonos en la relación: por cada cm 4.2 voltios.
- Posterior a la electroforesis realizamos la visualización de los geles de agarosa mediante el transiluminador UV-INVITROGEN; fotodocumentamos los geles con la ayuda de la cámara SONY DSLR-A380 para su posterior análisis.

3.9. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

TABLA N°6 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION	INSTRUMENTO	ESCALA	INDICADOR
Número de tripletas CAG.	Número de repeticiones de citosina, adenina y guanina en el exón 1 del gen <i>IT15</i> que poseen los pacientes participantes en el estudio.	Regresión de la distancia que migra la banda en el gel de agarosa.	Cuantitativa	Milímetros
Distancia de migración de las bandas de los fragmentos amplificados.	Distancia en milímetros que migra el amplicon en el gel de agarosa	Regla de medición del programa ImageJ.	Cuantitativa	Milímetros
Enfermedad de Huntington.	Individuos que poseen más de 40 repeticiones del trinucleótido CAG en el exón 1 del gen <i>IT15</i> .	Distancia de migración de bandas.	Cuantitativa	Frecuencia relativa (%).
$\% F. R. = \frac{\text{Pctes con mas de 40 repeticiones CAG.}}{\text{Total pctes.}} \times 100$				

3.10. CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad se utilizó una muestra conocida de un paciente que padece la enfermedad de Huntington, en cada una de las etapas como la extracción de ADN se usó un control negativo “agua” y control positivo “paciente con EH” posteriormente se verificó que sí se extrajo ADN mediante el Qubit. Luego se estandarizó las temperaturas de PCR con la muestra positiva de un paciente con EH, obteniendo así los grados centígrados óptimos para realizar la PCR.

En la etapa de amplificación usamos un control negativo que fue agua y un control positivo que consistió en colocar primers de beta actina para cada una de las muestras, demostrando así que en cada uno de los pacientes existía material genético que fue amplificado.

3.11. ASPECTOS ÉTICOS

Para la captación de pacientes que tengan un diagnóstico presuntivo de la enfermedad se enviaron peticiones por escrito dirigidas al Director del área de investigación y docencia de todas las instituciones participantes (Anexo 3), a su vez se adjuntaron todos los documentos necesarios como copia del proyecto, consentimiento informado, hojas de recolección de datos, así como otros documentos que el director requiriese en ese momento para la aprobación de captación de pacientes en dichas instituciones antes mencionadas.

Luego de obtener los datos de los pacientes, se procedió a comunicarnos con ellos, para comentarles sobre la investigación.

A cada uno de los pacientes que decidieron participar en el estudio, se les informó acerca de todo el procedimiento en el que iban a participar a través del consentimiento informado (Anexo 4). En dicho documento se encuentra detallada toda la información del proceso, para que el paciente se informe por si surgiese alguna inquietud.

En los casos en que existieron pacientes con deterioro mental debido a la enfermedad e individuos menores de edad con riesgo de poseer la mutación en el exón 1 del gen IT15, se procedió a informar a sus familiares o representantes legales acerca de la investigación en la que podrían participar, decidiendo así ellos su permanencia en el estudio.

Cabe indicar que el consentimiento informado fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad San Francisco de la ciudad de Quito en el año 2012.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se realizó la cuantificación de ADN de todas las muestras, obteniendo los siguientes resultados (TABLA N°7):

TABLA N°7 CANTIDAD MEDIA DE ADN EN MUESTRAS EXTRAÍDAS

	INFERIOR	SUPERIOR	
INTERVALO AL 97%	57.82	81.57	CON UN INTERVALO DE CONFIANZA DEL 97%, LA MEDIA DE CUANTIFICACION DE ADN MEDIANTE EL USO DE 100UL DE SANGRE TOTAL +100UL DE PBS VA DE 57,82 ng a 81,57 ng.
MEDIA	69.70		
DESVIACION M	41.32		
DESVIACION P	40.96		

La media de concentración de los 57 pacientes incluidos en el estudio es de 69.70 ng/uL, con un intervalo de confianza del 97% la media de ADN cuantificado mediante el uso de 100 uL de sangre total + 100 uL de PBS va desde 57.82 ng/uL a 81,57 ng/uL.

La cantidad de ADN puede variar debido a varios factores (Imagen 5), por ejemplo concentración de glóbulos blancos en muestra sanguínea, edad del paciente, estado de salud del paciente, además puede variar ligeramente debido al uso de la cuantificación en el equipo Qubit.

CUANTIFICACION DE ADN CON 100ul de PBS + 100ul de SANGRE TOTAL

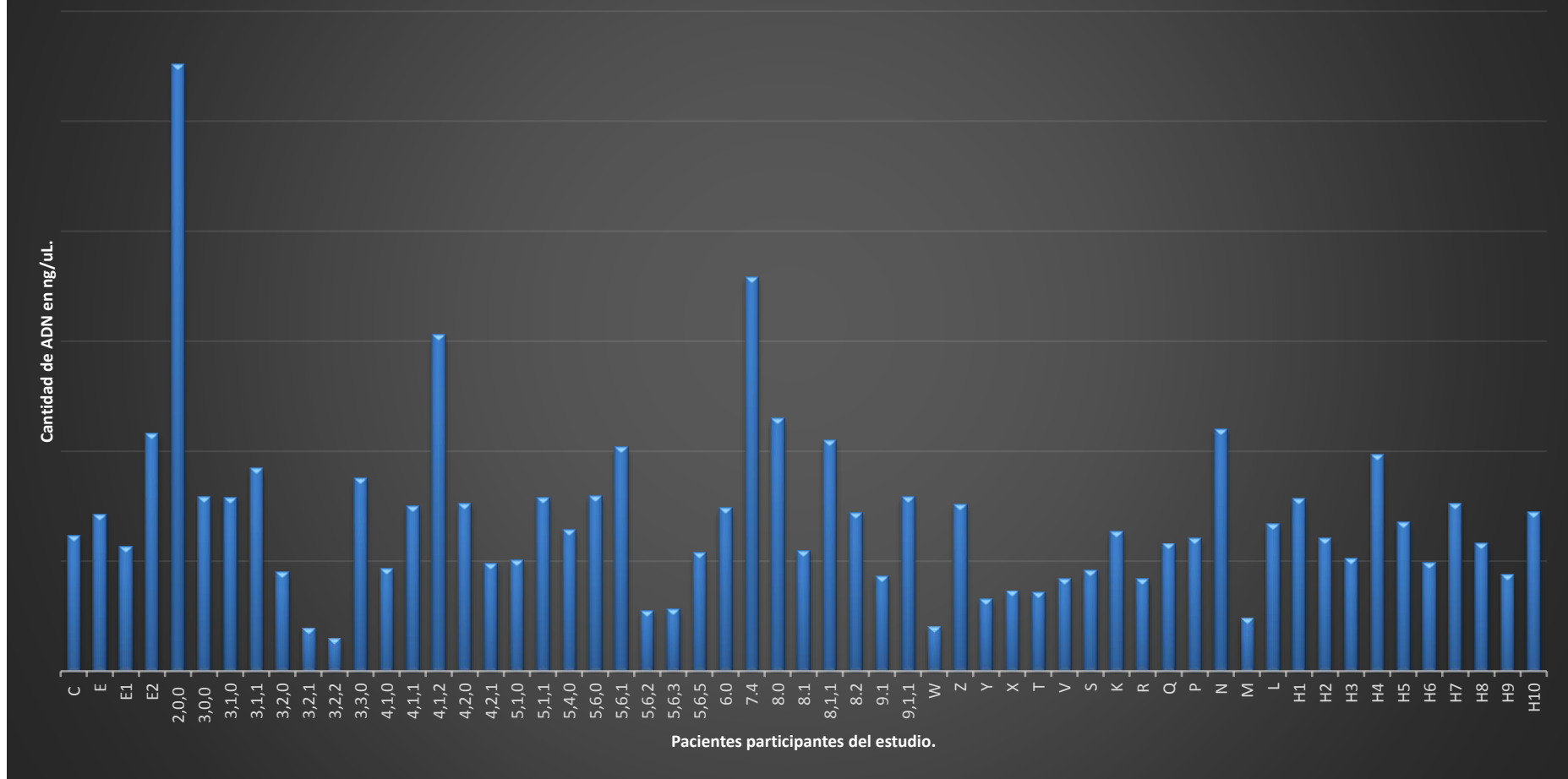


Imagen 5 "Cantidad deADN en ng/uL en cada uno de los pacientes participantes en el estudio".

TABLA N°8 CANTIDAD DE ADN EN LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.

Código del paciente.	Cantidad de ADN en ng/uL.		Código del paciente.	Cantidad de ADN en ng/uL.
2,0,0	276		W	20.5
3,0,0	79.3		Z	75.9
3,1,0	78.9		Y	33
3,1,1	92.3		X	36.5
3,2,0	45.1		T	36.1
3,2,1	19.8		V	42.2
3,2,2	15.2		S	45.9
3,3,0	87.7		K	63.6
4,1,0	46.6		R	41.9
4,1,1	74.9		Q	58
4,1,2	153		P	60.5
4,2,0	76.4		N	110
4,2,1	49.1		M	24.6
5,1,0	50.7		L	66.9
5,1,1	79.1		H1	78.5
5,4,0	64.4		H2	60.4
5,6,0	79.8		H3	51.3
5,6,1	102		H4	98.6
5,6,2	27.5		H5	67.7
5,6,3	28.2		H6	49.3
5,6,5	53.8		H7	76.4
6.0	74.2		H8	58.1
7.4	179		H9	43.9
8.0	115		H10	72.6
8.1	54.8		C	61.5
8,1,1	105		E	71.4
8.2	72.2		E1	56.8
9.1	43.4		E2	108
9,1,1	79.2			

4.2. ÁRBOLES GENEALÓGICOS

Se realizó un árbol genealógico de las familias involucradas en el estudio, en ciertos casos no se pudo acceder a información de ciertos pacientes debido a que ya no se encontraban con vida, o simplemente porque no decidieron participar en el estudio. Los pacientes que participaron en el estudio son aquellos que tienen una letra o un número dentro de la figura, los que no poseen estos caracteres son aquellos que no están incluidos en la investigación.

A continuación en la (Imagen 6) se detalla la simbología para mejor comprensión de los arboles:



Imagen 6 "Cuadro que indica el significado de cada uno de los símbolos usados en los árboles genealógicos"

En esta investigación se trabajó con 57 muestras sanguíneas de individuos, correspondientes a 5 familias y un paciente solo, todos estos pacientes tenían un familiar que había tenido un diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Huntington.

FAMILIA 1

Árbol genealógico de una familia (Imagen 7), en la cual se pudo obtener las muestras sanguíneas todos los hermanos de un progenitor que poseía la patología. Luego de realizar una PCR con los primers específicos para el gen que estamos buscando, se evidenció que los individuos H5 y H8 tienen una mutación en el gen, razón por la cual van a desarrollar la patología.

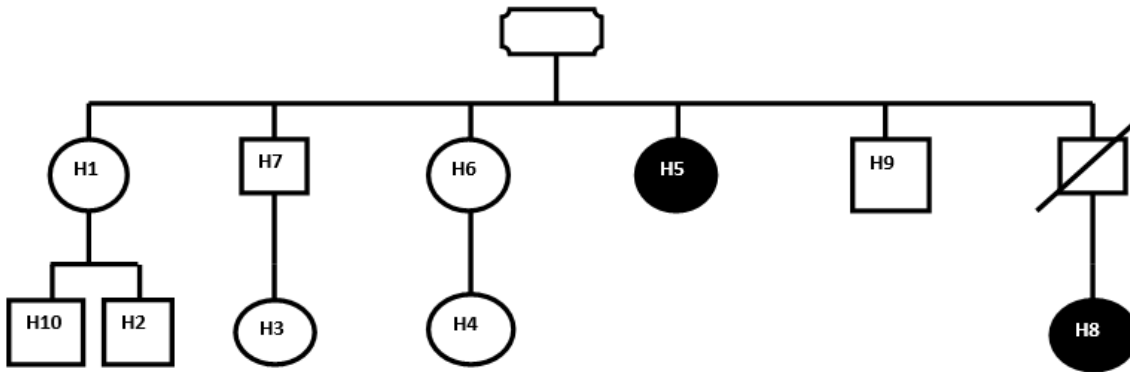


Imagen 7 "Árbol genealógico de la familia 1, el paciente H5 de sexo femenino de 44 años y la paciente H8 de sexo femenino de 22 años de edad poseen una mutación en el gen IT15"

FAMILIA 2

Árbol genealógico de una familia (Imagen 8), en la cual solo se pudo obtener las muestras sanguíneas de las dos últimas hijas y su respectiva descendencia. Luego de realizar una PCR con los primers específicos para el gen que estamos buscando, se evidenció que los individuos K, W, Z, Y, X luego de revelar el gen en geles de agarosa, poseían un alelo expandido para dicho gen, mientras que los pacientes T, V, S, no poseían ningún alelo expandido. Según la evidencia que poseemos podemos asumir que dichos pacientes tienen unos alelos mayores a 36 repeticiones de CAG en el exón 1 del gen IT15, lo cual indicaría que poseen o en un futuro podrían tener los síntomas de la enfermedad. Según la evidencia podemos deducir que el

paciente Z en su alelo expandido posee alrededor de 44 repeticiones de CAG, el paciente Y posee alrededor 45 repeticiones CAG, el paciente X tiene alrededor 46 repeticiones CAG, el paciente W presenta alrededor 45 repeticiones CAG, y el paciente K tiene alrededor 44 repeticiones CAG, todas estas repeticiones tienen en su alelo expandido. Cabe indicar que el paciente K es un individuo que ya fue diagnosticado clínicamente y genéticamente que posee la enfermedad de Huntington en una institución de salud.

Los otros pacientes de esta familia presentan un número de repeticiones menores a 36, es decir, no van a presentar la enfermedad.

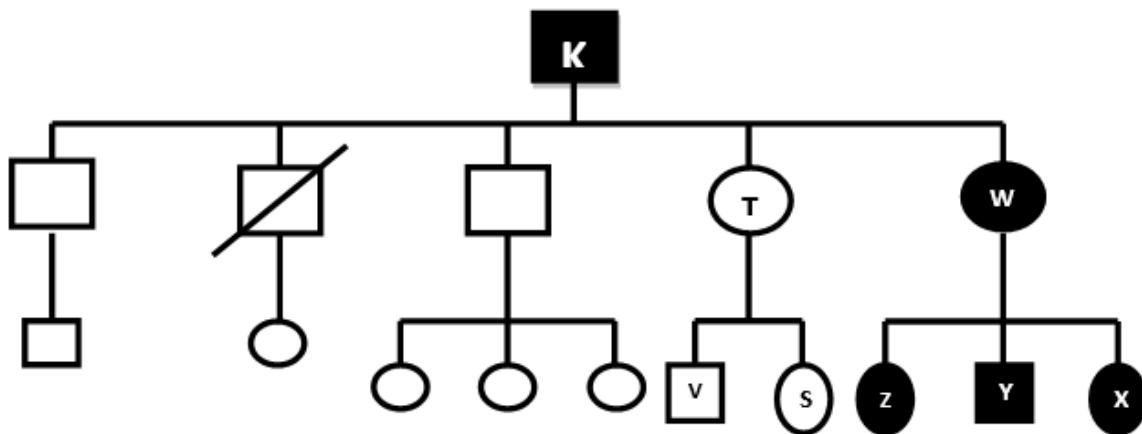


Imagen 8 "Árbol genealógico de la familia 2, el paciente K de 68 años, el paciente W con 35 años de edad, el paciente Z con 9 años de edad, el paciente Y con 6 años de edad y el paciente X con 2 años de edad tienen una expansión del trinucleótido CAG en el exon 1 del gen IT 15.

FAMILIA 3

Árbol genealógico, de una familia ubicada en la provincia de Manabí, en el kilómetro 40 de la vía Chone (Imagen 9), en la cual la madre poseía la alteración en el gen IT15, como es una enfermedad autosómica dominante el 50% de los hijos tiene la posibilidad de poseer la enfermedad. Podemos observar que 5 de los 6 hijos tenían movimientos incontrolados, lo que nos haría pensar que se trata de esta enfermedad, 3 de los 6 hijos han fallecido, el 3er hijo tiene movimientos coreicos muy pronunciados, mientras que el 5to hijo tiene temblor en sus manos, este tiene 2 hijos, el niño mayor tiene 7 años, y presenta movimientos leves incontrolados, lo cual se podría presumir que se trata de un Huntington juvenil.

Los pacientes de los cuales pudimos obtener las muestras sanguíneas fueron del paciente C, E, E1, E2.

Luego de realizar una PCR con los primers específicos para el gen que estamos buscando, se evidenció que los pacientes C, E, y E1 poseían un alelo expandido para dicho gen, mientras que el paciente E2 no poseía ningún alelo expandido.

Según la evidencia podemos deducir que el paciente C en su alelo expandido posee alrededor de 62 repeticiones de CAG, el paciente E tiene alrededor de 71 repeticiones y el paciente E1 posee más de 100 repeticiones del trinucleótido motivo que nos daría a sospechar que se trata de un caso de Huntington juvenil y esto justificaría la atribución de sus movimientos involuntarios.

La paciente C2 según las evidencias de este estudio tendría menos de 36 repeticiones del trinucleótido en el gen IT15.

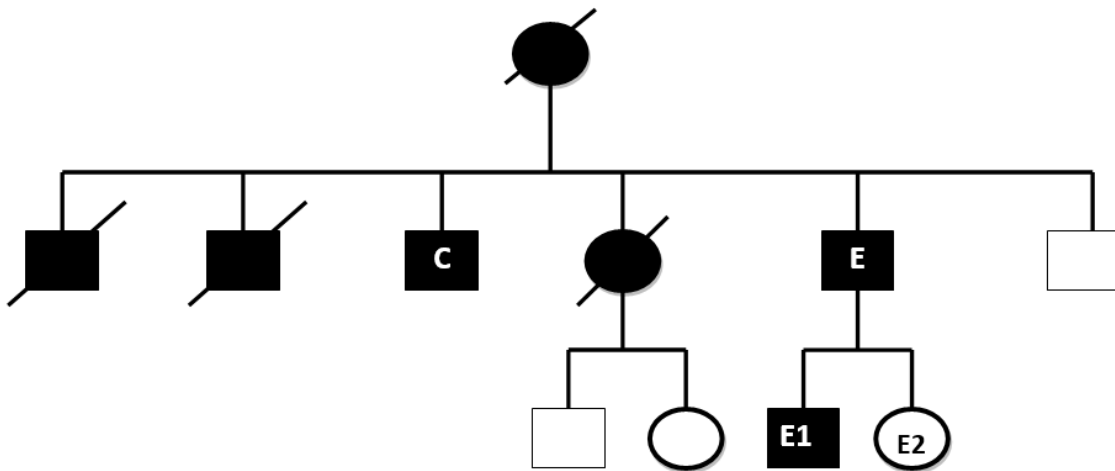


Imagen 9 “Árbol genealógico de la familia 3, el paciente C de 34 años de edad, el paciente E de 31 años de edad y el paciente E1 de 10 años de edad poseen una expansión del trinucleótido CAG en el exon 1 del gen IT15, todos estos pacientes ya presentan movimientos involuntarios debido al elevado número de repeticiones CAG, el individuo E1 tiene alrededor de 131 repeticiones de CAG razón por la cual se trataría de un caso de Huntington juvenil”.

FAMILIA 4

Árbol genealógico de la cuarta familia (Imagen 10), los elementos coloreados de negro con 4 puntos blancos en su interior son pacientes que referían movimientos involuntarios que podían ser confundidos con los síntomas de la Enfermedad de Huntington. Luego de realizar este estudio se pudo evidenciar que ninguno de los pacientes que participantes en el estudio tienen un alelo expandido para el gen IT15, luego de realizar el análisis todos los pacientes muestran menor a 36 repeticiones del trinucleótido, las evidencias indican que no se trata de una familia que sufra de un trastorno de la enfermedad de Huntington. El paciente 2 y la 9.1 que poseía movimientos involuntarios en los geles de agarosa tienen un único alelo que tienen menos de 36 repeticiones de CAG.

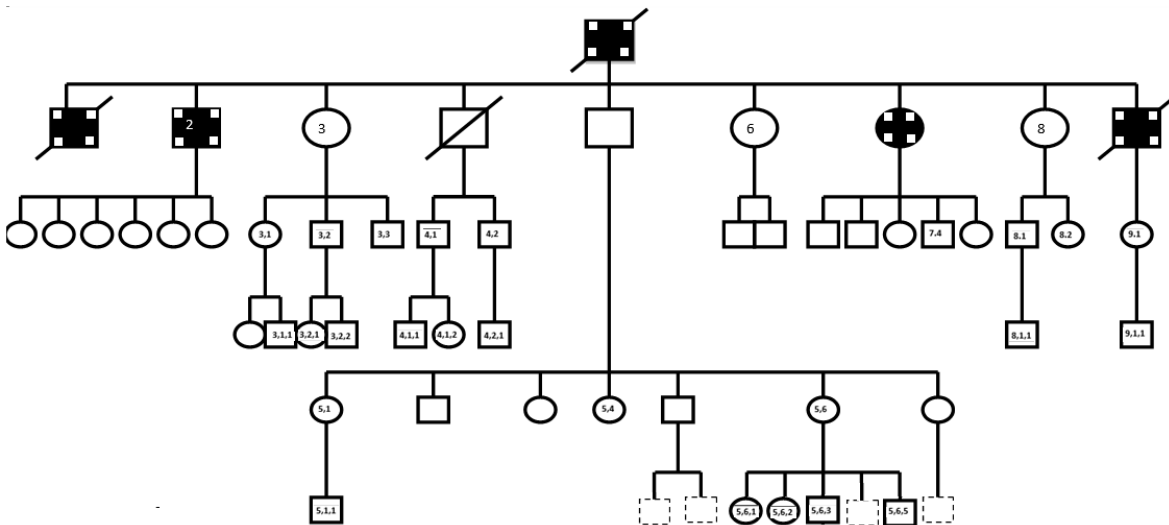


Imagen 10 "Árbol genealógico de la familia 4, ninguno de los pacientes involucrados en el estudio poseen una mutación en el gen estudiado".

FAMILIA 5

Árbol genealógico de la quinta familia (Imagen 11), luego de realizar una PCR con los primers específicos para el gen que estamos buscando, se evidenció que los pacientes P y Q poseían un alelo expandido para dicho gen, mientras que los pacientes M, N, L no poseían ningún alelo expandido. Luego de realizar el estudio pudimos llegar a la conclusión que el paciente P

tiene alrededor de 51 repeticiones del trinucleótido, mientras que el paciente Q posee alrededor de 44; los paciente L, M y N tienen menos de 36 repeticiones en el exón 1 del gen IT15.

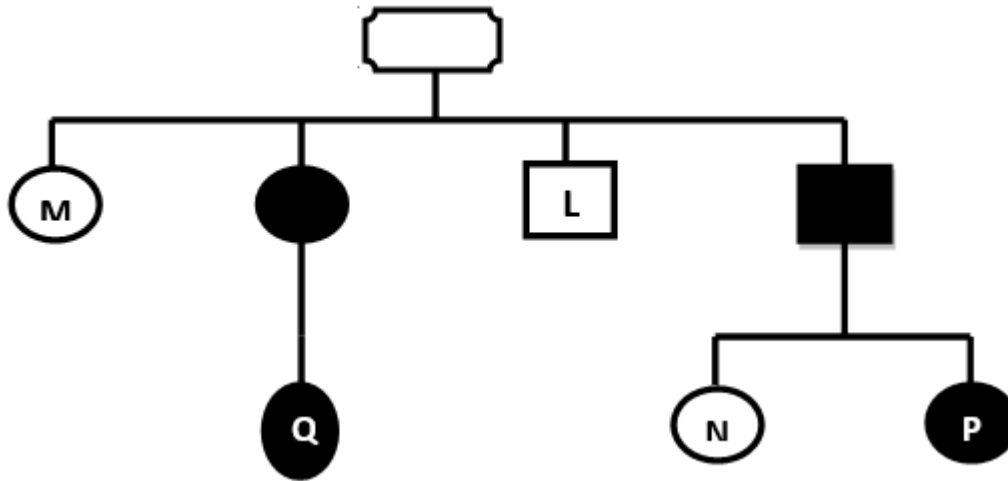


Imagen 11 "Árbol genealógico de la familia 5, el paciente Q de 22 años de edad y el paciente P de 22 años de edad tienen más de 36 repeticiones del trinucleótido CAG, razón por la cual van a expresar la patología".

En la (TABLA N°8) se detallan con distinto color las familias participantes en el estudio, para mayor comprensión, con un total de 57 pacientes correspondientes a 5 familias se obtuvieron 12 pacientes que manifestaron una mutación en el exón 1 del gen IT15 manifestando más de 36 repeticiones del trinucleótido CAG.

TABLA N°9 RESULTADOS LUEGO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN IT15.

#	CODIGO	FAMILIA	RESULTADO
1	H1	FAMILIA 1	NEGATIVO
2	H2		NEGATIVO
3	H3		NEGATIVO
4	H4		NEGATIVO
5	H5		POSITIVO
6	H6		NEGATIVO
7	H7		NEGATIVO
8	H8		POSITIVO
9	H9		NEGATIVO
10	H10		NEGATIVO
11	W	FAMILIA 2	POSITIVO
12	Z		POSITIVO
13	Y		POSITIVO
14	X		POSITIVO
15	T		NEGATIVO
16	V		NEGATIVO
17	S		NEGATIVO
18	K		POSITIVO
19	C	FAMILIA 3	POSITIVO
20	E		POSITIVO
21	E1		POSITIVO
22	E2		NEGATIVO
23	Q	FAMILIA 5	POSITIVO
24	P		POSITIVO
25	N		NEGATIVO
26	M		NEGATIVO
27	L		NEGATIVO
28	R	INDIVIDUO	NEGATIVO

#	CODIGO	FAMILIA	RESULTADO
29	2,0,0	FAMILIA 4	NEGATIVO
30	3,0,0		NEGATIVO
31	3,1,0		NEGATIVO
32	3,1,1		NEGATIVO
33	3,2,0		NEGATIVO
34	3,2,1		NEGATIVO
35	3,2,2		NEGATIVO
36	3,3,0		NEGATIVO
37	4,1,0		NEGATIVO
38	4,1,1		NEGATIVO
39	4,1,2		NEGATIVO
40	4,2,0		NEGATIVO
41	4,2,1		NEGATIVO
42	5,1,0		NEGATIVO
43	5,1,1		NEGATIVO
44	5,4,0		NEGATIVO
45	5,6,0		NEGATIVO
46	5,6,1		NEGATIVO
47	5,6,2		NEGATIVO
48	5,6,3		NEGATIVO
49	5,6,5	NEGATIVO	
50	6.0	NEGATIVO	
51	7.4	NEGATIVO	
52	8.0	NEGATIVO	
53	8.1	NEGATIVO	
54	8,1,1	NEGATIVO	
55	8.2	NEGATIVO	
56	9.1	NEGATIVO	
57	9,1,1	NEGATIVO	

4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Se realizó la PCR y electroforesis en geles de agarosa de todas las muestras correspondientes a un total de 57 pacientes de 5 familias, de los cuales se evidenció una expansión en el gen IT15 a 16 pacientes.

C; E1; E; P; Q; K; Z; W; Y; X; H5; H8; 3.2.1; 3.2.2; 5.6.1; 5.6.3; mientras que el resto de los pacientes no poseían una expansión. (Imagen 12, Imagen 13, Imagen 14).

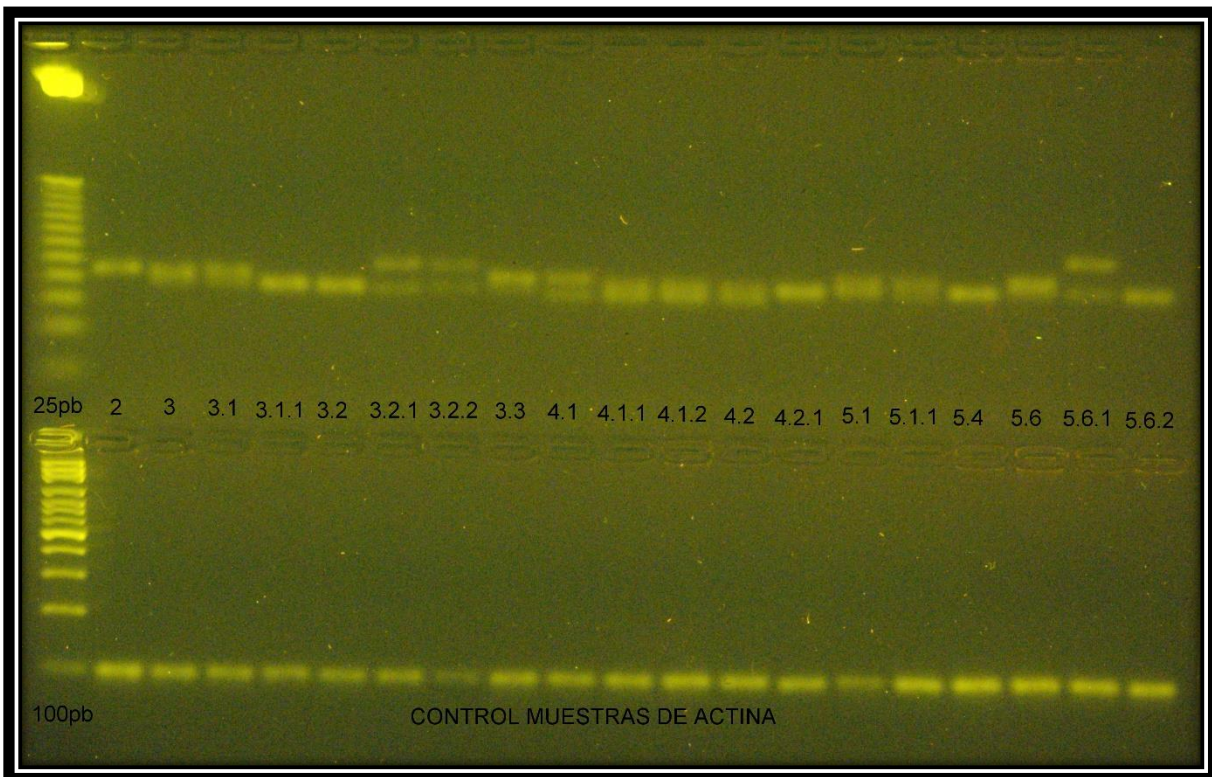


Imagen 12 "Gel de agarosa al 3% en el primer carril se encuentra el ladder de 25pb a 300pb, a continuación del ladder se encuentran los pacientes numerados en la imagen, se puede evidenciar que tanto el paciente 3.2.1 ; 3.2.2; 5.6.1; poseen dos bandas, es decir poseen una expansión en los alelos que se consideran normales comparándolas con el ladder, en la parte inferior se encuentra el control de amplificación usada, es decir, beta actina".

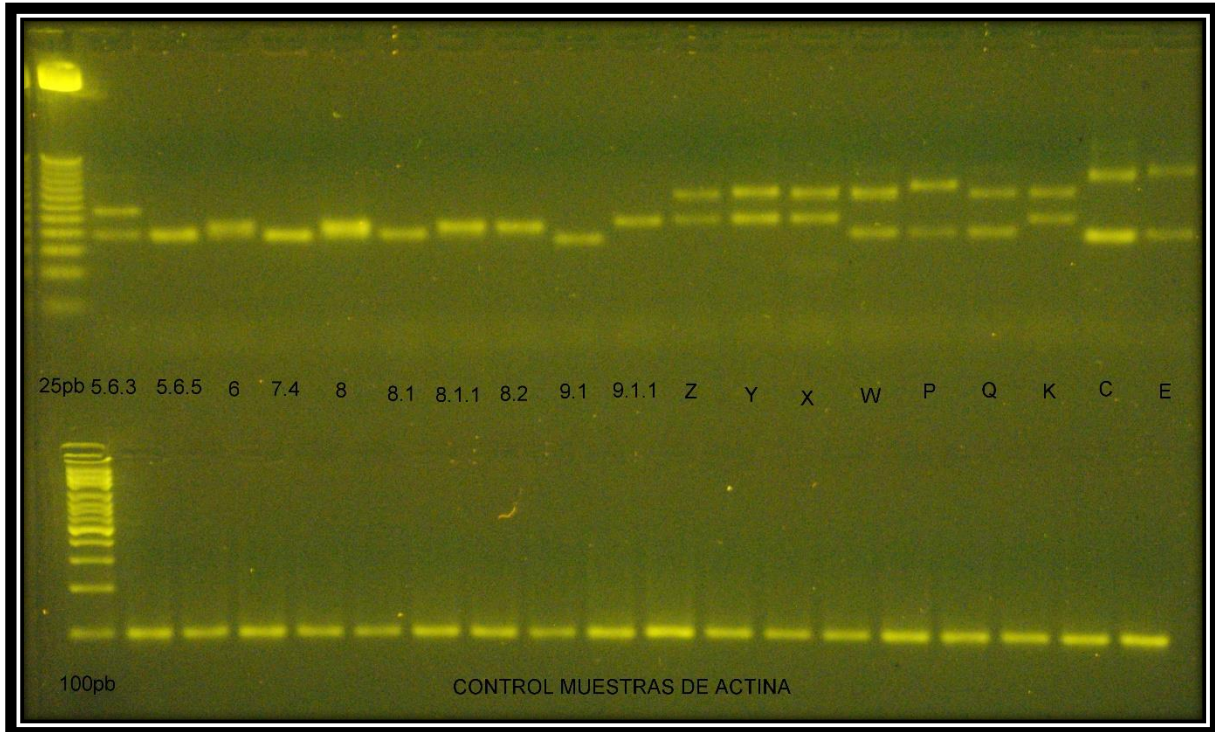


Imagen 13 "Gel de agarosa al 3%, en el primer carril se encuentra el ladder de 25pb a 300pb, el paciente 5.6.3 posee dos alelos con repeticiones normales, mientras que los pacientes Z, Y, X, W, P, Q, K, C, E, poseen alelos con repeticiones anormales, el resto de los pacientes en la imagen poseen alelos con un número de repeticiones normales, en la parte inferior se encuentran las mismas muestras amplificadas con los primers de beta actina".

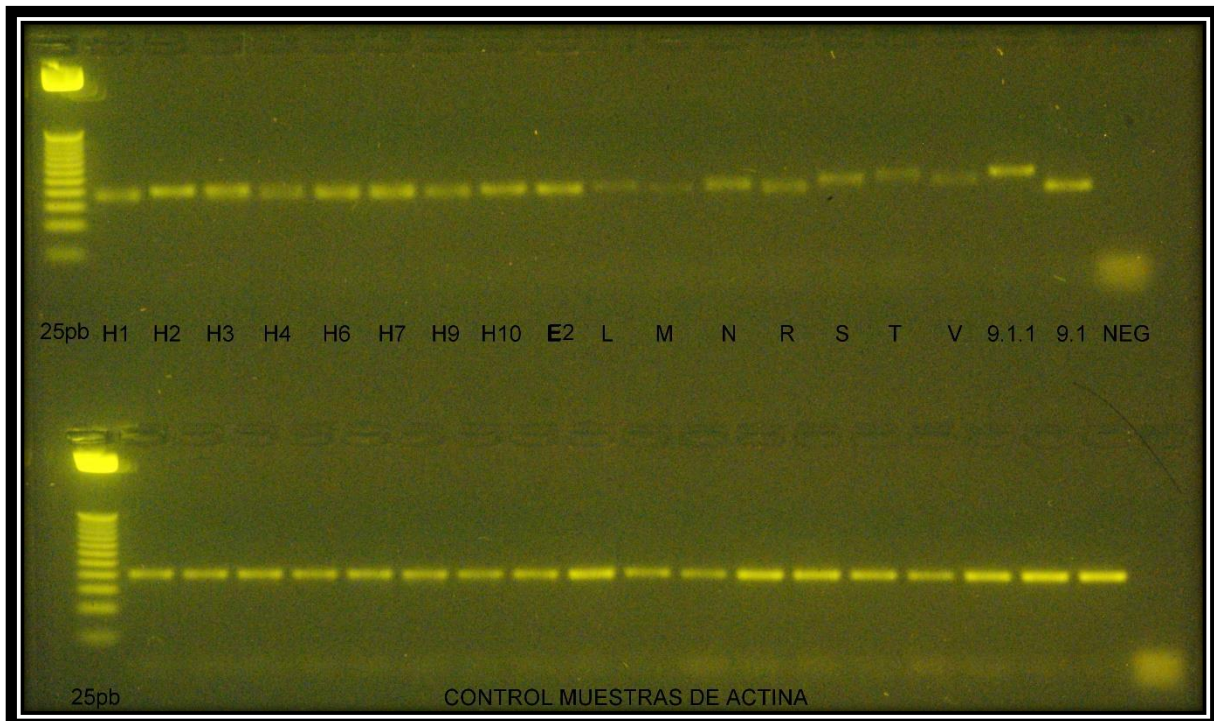


Imagen 14 "Gel de agarosa al 3%, en el primer carril se encuentra el ladder de 25pb a 300pb, en los siguientes carriles se encuentran los pacientes rotulados en la imagen se puede evidenciar que cada uno de los pacientes poseen un alelo con un número normal de repeticiones, en la parte inferior se encuentran cada uno de los pacientes con sus controles de beta actina".

Los pacientes antes nombrados poseen claramente un aumento de repeticiones CAG, pero se visualiza que los pacientes 3,2,1; 3,2,2; 5,6,1; 5,6,3; no tienen una expansión notoria, por lo cual se procedió a correr una electroforesis en geles de agarosa con el producto de PCR de estos pacientes y de los pacientes que tienen una expansión notoria en el gen (Imagen 15).

Claramente podemos evidenciar que las bandas de los pacientes 3,2,1; 3,2,2; 5,6,1; 5,6,3; se encuentran por debajo de la banda de peso molecular de 125 pb del ladder de peso molecular. Razón por la cual van a tener un número de repeticiones CAG menor a 36.

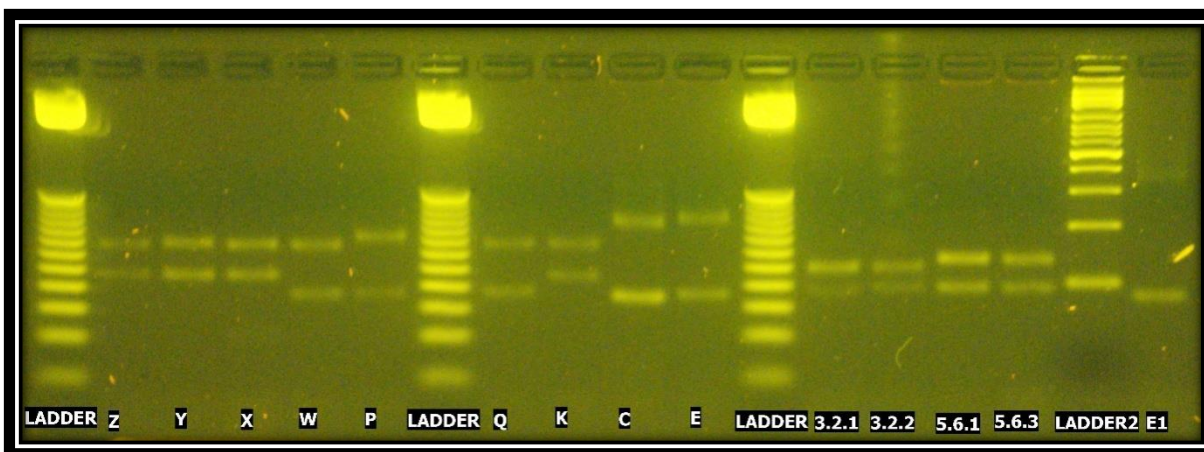


Imagen 15 "Gel de agarosa al 3% el ladder que se encuentra en el carril 1, 7, 12, es el que va de 25pb a 300pb, podemos evidenciar que los pacientes Z, Y, X, W, P, Q, K, C, E, E1 poseen una separación bien amplia entre sus bandas, lo que nos indicaría que tienen un alelo normal y otro expandido. Observamos también que los pacientes 3,2,1; 3,2,2; 5,5,1; 5,6,3; poseen una expansión no muy amplia entre sus alelos y se visualiza claramente que se encuentra bajo la banda del ladder de 125 pb lo que nos indicaría que tienen 2 alelos menores a 36pb.

Los pacientes que tienen claramente la expansión son los pacientes C, E1, E, P, Q, K, Z, W, Y, X, H5, H8 (Imagen 16). Estos pacientes claramente superan la banda de 150 pares de bases del ladder de peso molecular; no podemos saber con exactitud el número de repeticiones CAG que tiene cada paciente ya que esto solo se conocería mediante la técnica de secuenciación y debido a que contamos con pocos recursos económicos nos limitaremos a establecer un número aproximado de repeticiones CAG mediante métodos estadísticos.

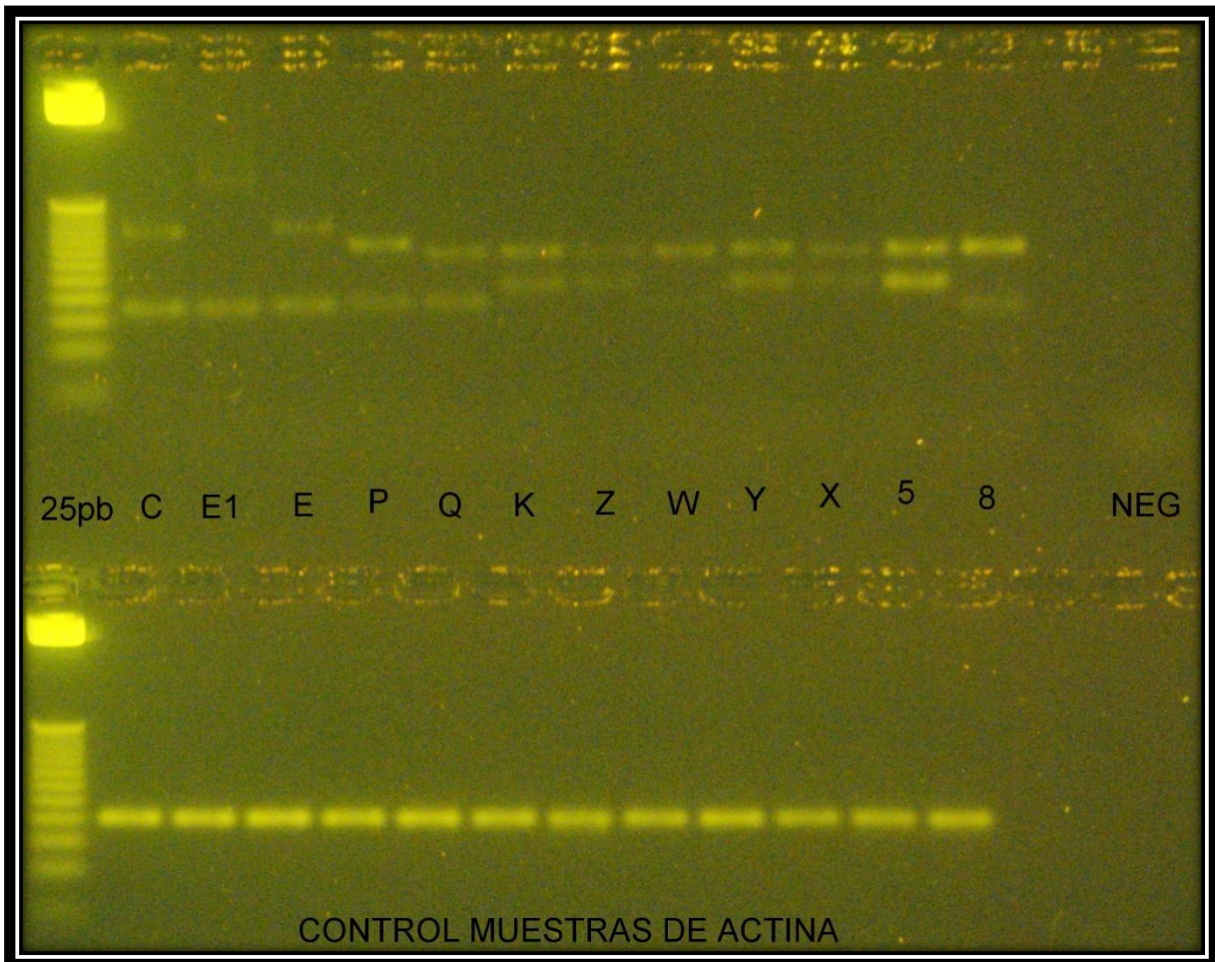


Imagen 16 "Gel de agarosa al 3%, en el que se encuentran todos los pacientes que poseen una expansión en exón 1 del gen IT15, en el carril 1 se encuentra el ladder de 25pb a 300pb en el resto de carriles se encuentran los pacientes con un alelo normal y otro expandido, podemos evidenciar claramente que todos los pacientes enumerados en el gel superan la banda del ladder de 150pb lo que nos indicaría que estos individuos superan los 36pb".

Para establecer el número aproximado de repeticiones CAG se realizó una regresión exponencial, ya que esta fue la que más se aproximaba a lo que nos encontrábamos buscando. Se realizó una regresión en base a los datos del ladder 25bp DNA Step Ladder de marca Promega que va de 25 pb a 300pb, en la regresión se usaron datos del peso molecular y la distancia recorrida por sus bandas, obteniendo así una ecuación $y = 2423e^{-0.143x}$ donde la variable "x" es la distancia recorrida en milímetros por los amplicones de los pacientes, de esta forma se obtuvo el número de pares de bases de cada amplicon de los pacientes que consideramos positivos (Imagen 17).

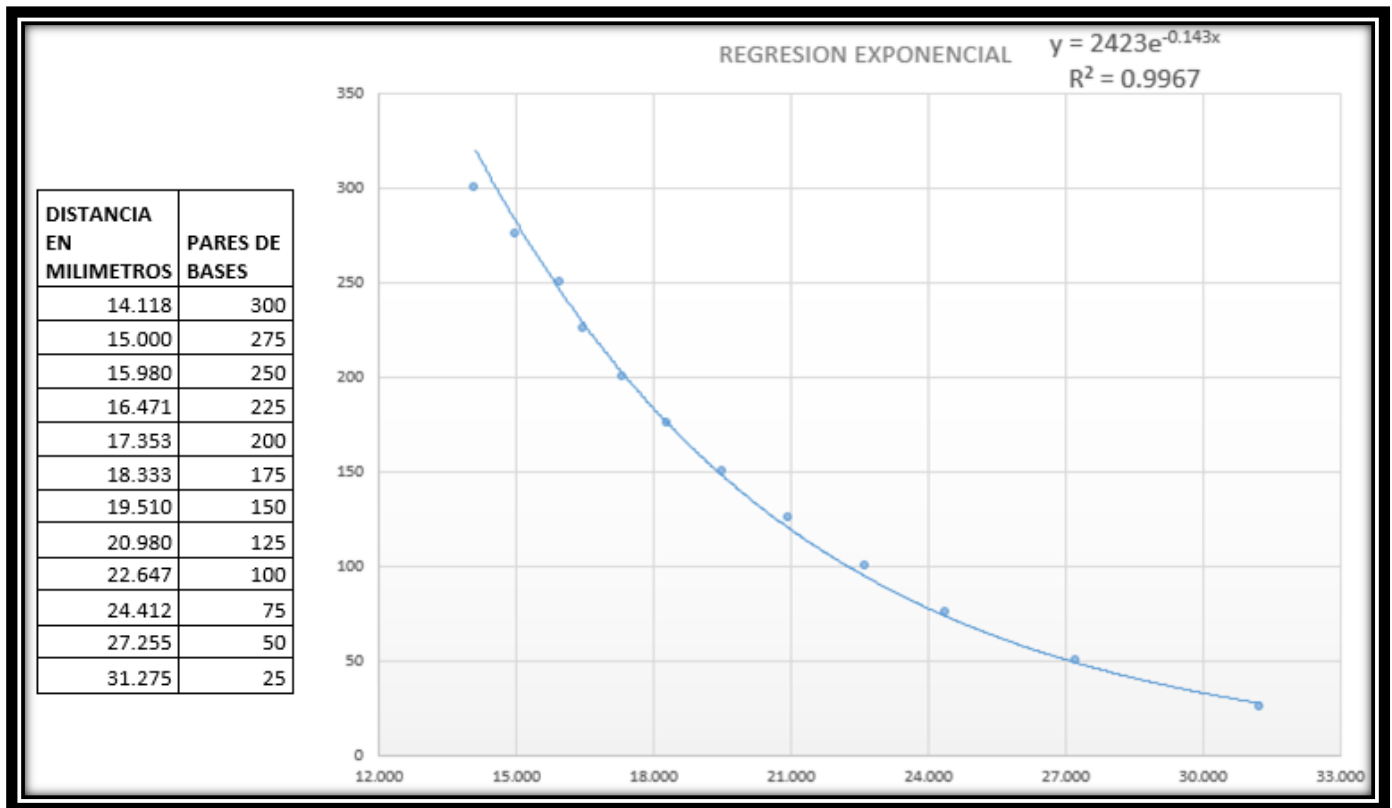


Imagen 17 "Imagen de la regresión exponencial realizada en base al número de bases del ladder y distancia de migración de las bandas en milímetros, en el eje X se encuentra la distancia de migración de las bandas en milímetros y en el eje Y se encuentra el número de pares de bases del ladder".

Luego para obtener el número de repeticiones CAG se restó 40 pares de bases al número total de pares de bases, se realizó esta resta de 40pb debido a que ese era el tamaño de los primers, una vez obtenido ese valor se dividió para 3, obteniendo así el número de repeticiones CAG.

$$\#CAG = \frac{PB - (IT15 F + IT15R)}{3}$$

Esta regresión se realizó a todos los pacientes que tenían claramente una expansión, logrando obtener una aproximación del número de repeticiones de tripletas CAG indicadas en la (TABLA N°9):

TABLA N°9 NÚMERO APROXIMADO DE REPETICIONES CAG EN LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.

PACIENTE	DISTANCIA EN MILIMETROS	PARES DE BASES	NÚMERO DE REPETICIONES CAG	RESULTADO	EDAD
C	23.824	80.31	13	NEGATIVO	34 Años
C	16.569	226.65	63	POSITIVO	
E1	24.216	75.93	12	NEGATIVO	10 Años
E1	12.059	431.96	131	POSITIVO	
E	23.333	86.15	15	NEGATIVO	31 Años
E	15.784	253.57	71	POSITIVO	
P	23.333	86.15	15	NEGATIVO	22 Años
P	17.745	191.56	51	POSITIVO	
Q	23.039	89.85	17	NEGATIVO	22 Años
Q	18.627	168.87	43	POSITIVO	
K	21.732	108.32	23	NEGATIVO	68 Años
K	18.497	172.03	44	POSITIVO	
Z	21.242	116.18	25	NEGATIVO	9 Años
Z	18.497	172.03	44	POSITIVO	
W	23.007	90.27	17	NEGATIVO	35 Años
W	18.399	174.46	45	POSITIVO	
Y	21.340	114.56	25	NEGATIVO	6 Años
Y	18.399	174.46	45	POSITIVO	
X	21.275	115.63	25	NEGATIVO	2 Años
X	18.235	178.60	46	POSITIVO	
H5	21.569	110.87	24	NEGATIVO	44 Años
H5	18.431	173.67	45	POSITIVO	
H8	23.333	86.15	15	NEGATIVO	22 Años
H8	17.941	186.27	49	POSITIVO	

DISCUSIÓN

Como en los resultados se indicó que luego de haber realizado la PCR y electroforesis en geles de agarosa de todas las muestras de los 57 pacientes de 5 familias que participaron en el estudio, en los cuales se evidenció una expansión en el gen IT15 a 16 pacientes, pero esto no significa necesariamente que los 16 pacientes van a tener la patología, ya que anteriormente indicamos que los pacientes que tienen la patología son aquellos que tienen un número mayor a 36 repeticiones de CAG en dicho gen. Los 16 pacientes que tienen la expansión son los individuos C ,E1 ,E ,P ,Q ,K ,Z ,W ,Y ,X ,H5 ,H8 , 3,2,1; 3,2,2; 5,6,1; 5,6,3 luego de realizar la regresión para determinar un aproximado del número de repeticiones del trinucleótido se evidencio que los pacientes 3,2,1; 3,2,2; 5,6,1; 5,6,3 no tenían una expansión mayor a 36 repeticiones (Imagen 18). Luego de realizar la regresión se pudo evidenciar que el número de repeticiones CAG es menor a 36 (Tabla N°10).



Imagen 18 "Gel de agarosa al 3% en donde se encuentran los pacientes que poseen 2 alelos normales, es decir, poseen una expansión del trinucleótido que no es patógena".

TABLA N°10 RESULTADOS DE REGRESION EN PACIENTES DUDOSOS.

Alelo del paciente	Distancia en milímetros	Pares de bases	Número de repeticiones CAG	Resultado	Patología
3.2.1 ALELO CORTO	2,111	90,988	17	NEGATIVO	NO
3.2.1. ALELO LARGO	1,889	126,97	29	NEGATIVO	PRESENTA
3.2.2 ALELO LARGO	1,889	126,97	29	NEGATIVO	NO
3.2.2 ALELO CORTO	2,094	93,34	18	NEGATIVO	PRESENTA
5.6.1 ALELO CORTO	2,094	93,34	18	NEGATIVO	NO
5.6.1 ALELO LARGO	1,815	141,89	34	NEGATIVO	PRESENTA
5.6.3 ALELO LARGO	1,815	141,89	34	NEGATIVO	NO
5.6.3 ALELO CORTO	2,094	93,34	18	NEGATIVO	PRESENTA

TABLA N°9 NÚMERO APROXIMADO DE REPETICIONES CAG EN LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.

PACIENTE	DISTANCIA EN MILIMETROS	PARES DE BASES	NÚMERO DE REPETICIONES CAG	RESULTADO	EDAD
C	23.824	80.31	13	NEGATIVO	34 Años
C	16.569	226.65	63	POSITIVO	
E1	24.216	75.93	12	NEGATIVO	10 Años
E1	12.059	431.96	131	POSITIVO	
E	23.333	86.15	15	NEGATIVO	31 Años
E	15.784	253.57	71	POSITIVO	
P	23.333	86.15	15	NEGATIVO	22 Años
P	17.745	191.56	51	POSITIVO	
Q	23.039	89.85	17	NEGATIVO	22 Años
Q	18.627	168.87	43	POSITIVO	
K	21.732	108.32	23	NEGATIVO	68 Años
K	18.497	172.03	44	POSITIVO	
Z	21.242	116.18	25	NEGATIVO	9 Años
Z	18.497	172.03	44	POSITIVO	
W	23.007	90.27	17	NEGATIVO	35 Años
W	18.399	174.46	45	POSITIVO	
Y	21.340	114.56	25	NEGATIVO	6 Años
Y	18.399	174.46	45	POSITIVO	
X	21.275	115.63	25	NEGATIVO	2 Años
X	18.235	178.60	46	POSITIVO	
H5	21.569	110.87	24	NEGATIVO	44 Años
H5	18.431	173.67	45	POSITIVO	
H8	23.333	86.15	15	NEGATIVO	22 Años
H8	17.941	186.27	49	POSITIVO	

Luego de realizar la regresión observamos claramente que todos los pacientes tienen un alelo normal y otro expandido, razón por la cual tienen un número mayor a 36 repeticiones CAG y por ende van a desarrollar la Enfermedad de Huntington (Tabla 10) , se observa que el paciente E1 supera las 90 repeticiones CAG razón por la cual sufre de un caso de Huntington juvenil. La mayoría de pacientes que participaron en el estudio tienen alrededor de 43 repeticiones de CAG.

En esta regresión exponencial no se incluyeron los pacientes 321, 322, 561, 563, ya que ellos no tienen una expansión notoria “una distancia considerable entre sus 2 amplicones”, decidimos realizar el gel por separado junto con la regresión, obteniendo así los siguientes resultados (Tabla N°9):

TABLA N°10 RESULTADOS DE REGRESION EN PACIENTES DUDOSOS.

Alelo del paciente	Distancia en milímetros	Número de repeticiones CAG	Pb	Resultado	Patología
3.2.1 ALELO CORTO	2,111	90,988	17	NEGATIVO	NO
3.2.1. ALELO LARGO	1,889	126,97	29	NEGATIVO	PRESENTA
3.2.2 ALELO LARGO	1,889	126,97	29	NEGATIVO	NO
3.2.2 ALELO CORTO	2,094	93,34	18	NEGATIVO	PRESENTA
5.6.1 ALELO CORTO	2,094	93,34	18	NEGATIVO	NO
5.6.1 ALELO LARGO	1,815	141,89	34	NEGATIVO	PRESENTA
5.6.3 ALELO LARGO	1,815	141,89	34	NEGATIVO	NO
5.6.3 ALELO CORTO	2,094	93,34	18	NEGATIVO	PRESENTA

Evidenciamos que dichos pacientes tienen los 2 alelos normales razón por la cual no van a desarrollar la patología, claramente en el gel de agarosa se evidencia que la distancia entre los dos amplicones no es muy grande en comparación con los pacientes que si poseen la patología.

CONCLUSIONES

- Se logró detectar 12 pacientes que poseían un alelo expandido en el exón 1 del gen IT15; 2 individuos de la familia 1, 5 individuos de la familia 2, 3 individuos de la familia 3 y 2 individuos de la familia 5; evidenciando la presencia de más de 36 repeticiones del trinucleótido CAG en dicho exón del gen. Del número antes mencionado 5 poseían un sexo masculino y 7 un sexo femenino.
- El rango de repeticiones del trinucleótido en los pacientes que tienen una mutación en el gen IT15 fue 43 a 131 repeticiones, se puede concluir que mientras más repeticiones la edad de aparición de la enfermedad es más temprana, es el caso del paciente E1 es un caso de Huntington juvenil.
- Obtuvimos un individuo menor a 10 años que presentaba una serie de movimientos incontrolados, luego del estudio concluimos que el paciente tiene alrededor de 131 repeticiones del trinucleótido, lo que nos indicaría que se trata de un caso de Huntington juvenil.
- En los pacientes que tenían más repeticiones de CAG se pudo evidenciar que los síntomas aparecieron relativamente más temprano que aquellos pacientes que tienen menor número de repeticiones CAG.

- El éxito en el procesamiento de las muestras de los individuos participantes en el estudio se debió a que en cada una de las etapas de la investigación se llevó un minucioso control de calidad empleando técnicas adecuadas tanto en la manipulación, procesamiento y conservación de las muestras, también el éxito se debió a que se logró estandarizar de una excelente manera los procedimientos de la PCR.
- Es de gran importancia instaurar un estudio a gran escala en el que podamos saber la realidad de la enfermedad en nuestro país, estandarizar el método diagnóstico para evitar diagnósticos erróneos y así dar un asesoramiento psicológico a los familiares de pacientes así como a los individuos que portan la enfermedad de Huntington.

RECOMENDACIONES

Después de haber culminado este estudio se recomienda:

1. Realizar la secuenciación a las muestras positivas y negativas, lamentablemente no se pudo realizar esta técnica en este estudio debido a la cantidad limitada de presupuesto; mediante la técnica de secuenciación se puede determinar el número exacto de repeticiones de tripletas CAG en cada uno de los pacientes.
2. Efectuar la cuantificación de ADN mediante un método directo y no en el equipo del Quibit, ya que debido al proceso que implica pipetear la solución de ADN existe un error ligero en la cuantificación del material genético, se recomienda usar un equipo como el Nanodrop.
3. Usar geles de poliacrilamida en lugar de geles de agarosa para lograr evidenciar de mejor manera los amplicones en los geles, ya que ciertas bandas no se lograron observar claramente.
4. Usar como enzima para futuros estudios de Huntington la go taq master mix, ya que esta enzima contienen todos los elementos necesarios para la PCR en concentraciones adecuadas y así se ahorraría el tiempo de colocar en la master mix cada componente de la misma.

5. Continuar con estudios relacionados con el tema, por ejemplo la relación que existe entre el número de tripletas CAG y edad de aparición de la enfermedad, otro tema que podría continuar con la investigación es determinar la relación que existe cuando el padre es la persona que transmite el gen mutado a su hijo, ya que se ha comprobado con otros estudios que el número de repeticiones aumenta considerablemente en dichos casos.

ANEXOS

ANEXO 1

Invitrogen Custom Primers

Certificate of Analysis

GUSTAVO VENEGAS	
Order Number:	78389139
Order Date:	23-Jul-2012

Primer: 34 (Order Line No.: 14)

Primer Name: IT15 - F
Researcher: F. Paredes
Sequence (5' to 3'): (DNA) - CCTTCGAGTCCTCAAGTCCTC

Primer Number: 212096C12
Primer Length: 23
Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): 6,887.6
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol): 220.4
 μg per OD: 31.25
nmoles per OD: 4.54

Purity	Desalt	OD's	9.09
T_m (1M Na⁺)	86.00	μg's	283.96
T_m (50 mM Na⁺)	65.00	nmoles	41.3
% GC Content:	57.00		

Notes:

Primer: 36 (Order Line No.: 16)

Primer Name: HD1 - R
Researcher: F. Paredes
Sequence (5' to 3'): (DNA) - GGCGGTGGCGGCTGTTG

Primer Number: 212096D02
Primer Length: 17
Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): 5,315.4
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol): 177.4
 μg per OD: 29.96
nmoles per OD: 5.64

Purity	Desalt	OD's	7.49
T_m (1M Na⁺)	91.00	μg's	224.52
T_m (50 mM Na⁺)	70.00	nmoles	42.3
% GC Content:	77.00		

Notes:

Page 1 of 1 (printed 7/24/2012 at 1:17:56PM)

FOR LABORATORY RESEARCH USE ONLY.

Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established



 invitrogen™



Usage Information

I. Standard Application

Reagents to Be Supplied by the User

- PCR Nucleotide Mix (Cat.# C1141, C1145)
- Nuclease-Free Water (Cat.# P1193)
- upstream primer
- downstream primer
- template DNA

- In a sterile, nuclease-free microcentrifuge tube, combine the following on ice:

Component	Final Volume	Final Concentration
5X Green or Colorless GoTaq® Flexi Buffer†	10µl	1X
MgCl ₂ Solution, 25mM	2–8µl	1.0–4.0mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	1µl	0.2mM each dNTP
upstream primer	Xµl	0.1–1.0µM
downstream primer	Yµl	0.1–1.0µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0.25µl	1.25u
template DNA	Zµl	<0.5µg/50µl
Nuclease-Free Water to	50µl	

†Thaw completely and vortex thoroughly prior to use.

- If using a thermal cycler **without a heated lid**, overlay the reaction mix with 1–2 drops (approximately 50µl) of mineral oil to prevent evaporation during thermal cycling. Centrifuge the reactions in a microcentrifuge for 5 seconds.
- Perform PCR using your standard parameters. An example profile is given in Table 1. For the cycling protocol, we recommend the following:
 - Reactions are placed in a thermal cycler that has been preheated to 95°C.
 - The thermal cycling protocol has an initial denaturation step where samples are heated at 95°C for 2 minutes to ensure that the target DNA is completely denatured. Initial denaturation of longer than 2 minutes at 95°C is unnecessary and may reduce yield.
 - The extension time should be at least 1min/kb target length.

Table 1. Recommended Thermal Cycling Conditions for GoTaq® DNA Polymerase-Mediated PCR Amplification. These guidelines are optimal for the Perkin Elmer thermal cycler model 480 or comparable thermal cyclers.

Step	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	95°C	2 minutes	1 cycle
Denaturation	95°C	0.5–1 minute	
Annealing	42–65°C*	0.5–1 minute	25–35 cycles
Extension	72°C	1min/kb	
Final Extension	72°C	5 minutes	1 cycle
Soak	4°C	Indefinite	1 cycle

*Annealing temperature should be optimized for each primer set based on the primer T_m.

- Separate the PCR products by agarose gel electrophoresis and visualize with ethidium bromide or any other means. For reactions containing the 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, load the reaction onto the gel directly after amplification. Reactions containing the 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer also can be loaded directly into the wells of an agarose gel, but a tracking dye will need to be added to monitor the progress of electrophoresis.

II. General Considerations

A. Enzyme Concentration

We have found that 1.25 units of GoTaq® DNA Polymerase per 50µl amplification reaction is adequate for most amplifications. Adding extra enzyme generally does not produce significant increases in yield. However, in some cases, more enzyme may be beneficial. Please be aware that excessive amounts of enzyme and excessively long extension times increase the likelihood of generating artifacts due to the intrinsic 5'→3' exonuclease activity of Taq DNA polymerase.

B. Buffer Choice

We recommend using the 5X Green GoTaq® Flexi Buffer in any amplification reaction that will be visualized by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. The 5X Green GoTaq® Flexi Buffer is not recommended for any downstream applications using absorbance or fluorescence excitation, as the yellow and blue dyes in the reaction buffer may interfere with these applications. The dyes absorb between 225–300nm, making standard A₂₆₀ readings to determine DNA concentration unreliable. Also, the dyes have excitation peaks at 488nm and between 600–700nm that correspond to the excitation wavelengths commonly used in fluorescence detection instrumentation. However, for some instrumentation, such as a fluorescent gel scanner that uses a 488nm excitation wavelength, there will be minimal interference, since it is the yellow dye that absorbs this wavelength. Gels scanned by this method will have a light gray dye front below the primers corresponding to the yellow dye front. The Green and Colorless GoTaq® Flexi Buffers give approximately equivalent amplification yields. Balanced amplifications between the two buffers may require further optimization.

For reactions going directly from thermal cycler to an application using absorbance or fluorescence, the 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer is recommended. If both agarose gel analysis and further downstream applications involving absorbance or fluorescence will be used, the two dyes can be removed from the Green GoTaq® Flexi reactions using standard PCR clean-up systems like the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Cat.# A9281) or the Wizard® SV 96 PCR Clean-Up System (Cat.# A9341).

Both reaction buffers are compatible with common PCR additives such as DMSO and betaine. These additives do not change the color of the Green GoTaq® Flexi Buffer or affect dye migration.

C. Primer Design

PCR primers generally range in length from 15–30 bases and are designed to flank the region of interest. Primers should contain 40–60% (G + C), and care should be taken to avoid sequences that might produce internal secondary structure. The 3'-ends of the primers should not be complementary to avoid the production of primer-dimers. Primer-dimers unnecessarily deplete primers from the reaction and result in an unwanted polymerase reaction that competes with the desired reaction. Avoid three G or C nucleotides in a row near the 3'-end of the primer, as this may result in nonspecific primer annealing, increasing the synthesis of undesirable reaction products. Ideally, both primers should have nearly identical melting temperatures (T_m); in this manner, the two primers should anneal roughly at the same temperature. The annealing temperature of the reaction is dependent upon the primer with the lowest T_m. For assistance with calculating the T_m of any primer, a T_m Calculator is provided on the BioMath page of the Promega web site at: www.promega.com/biomath/

D. Amplification Troubleshooting

To overcome low yield or no yield in amplifications (e.g., mouse tail genotyping applications), we recommend the following suggestions:

- Adjust annealing temperature. The reaction buffer composition affects the melting properties of DNA. See BioMath Calculator to calculate the melting temperature for primers in the GoTaq® reaction (www.promega.com/biomath/).
- Minimize the effect of amplification inhibitors. Some DNA isolation procedures, particularly genomic DNA isolation, can result in the copurification of amplification inhibitors. Reduce the volume of template DNA in reaction or dilute template DNA prior to adding to reaction. Diluting samples even 1:10,000 has been shown to be effective in improving results, depending on initial DNA concentration.
- Increase template DNA purity. Include an ethanol precipitation and wash step prior to amplification to remove inhibitors that copurify with the DNA.
- Add PCR additives. Adding PCR-enhancing agents (e.g., DMSO or betaine) may improve yields. General stabilizing agents such as BSA (Sigma Cat.# A7030; final concentration 0.16mg/ml) also may help to overcome amplification failure.

Part# 9FIM629
Printed in USA, Revised 3/08

Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road • Madison, WI 53711-5399 U.S.A. • Toll Free in the USA 800-358-9526 • Telephone 608-274-4330 • Internet www.promega.com

ANEXO 3



Pontificia Universidad Católica del Ecuador ESCUELA DE BIOANÁLISIS

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
Apartado postal 17-01-2184
Fax: 593 - 2 - 2991546
Telf: 593 - 2 - 2991645
Quito - Ecuador

Quito, 05 de junio de 2012

Señor, Doctor
Carlos Troya
Director Médico del Hospital General Dr. Gustavo Domínguez

Presente.-

De mi consideración:

Por medio de la presente, solicito a usted una autorización para el señor José Fabricio Paredes Corrales; portador de la cédula de identidad no 0503576670 egresado de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito (PUCE), con el propósito de obtener y recolectar datos y muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Huntington que se han presentado al Hospital General Dr. Gustavo Domínguez de la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Con los datos y resultados de esta investigación el señor José Fabricio Paredes Corrales realizará y disertará la tesis de licenciatura.

Agradeciéndole su atención a la presente, me suscribo de usted

Atentamente.

Avilés-Reyes Rolando Xavier, Ph.D.
Profesor Investigador,
Escuela de Bioanálisis - PUCE
Programa PROMETEO-SENESCYT
Telf: 593-2-2991700 Ext.1052
FAX: 593-2-2991646
RAVILES759@puce.edu.ec; roavilesreyes@gmail.com

RECEPCION DE COMUNICACIONES
DIRECCION
FECHA: 06/06/2012
HORA: 10:13
TRAMITE N° _____
FIRMA: Cristina

ANEXO 4

Código: 2012-23

**Formulario Consentimiento Informado
Universidad San Francisco de Quito
Comité de Bioética**

Título de la investigación: "PRESENCIA Y DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON EN PACIENTES ADULTOS Y JÓVENES, HOMBRES Y MUJERES, QUE TENGAN UN DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA ENFERMEDAD".

Versión y Fecha: Versión 3; 12/06/12

Organización del investigador: (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, SENESCYT, Programa Prometeo)

Nombre del Investigador principal: Rolando Xavier Avilés Reyes

Co-investigadores: Msc. Pablo Palacios; Msc Sandra Andrade; Msc Delia Sosa

Número telefónico y correo electrónico del investigador principal:
095775042; roavilesreyes@gmail.com; RAVILES759@puce.edu.ec

1. Introducción

Usted ha sido invitado a participar en la investigación de presencia y diagnóstico genético molecular de la enfermedad de Huntington en pacientes adultos (30-55 años) y jóvenes (menores a 20 años) con diagnóstico presuntivo (reconocimiento de una enfermedad o un trastorno a partir de la observación de sus signos, síntomas, comportamiento), en diferentes unidades operativas de salud pública y privada del Ecuador.

Su participación es una elección; tome el tiempo necesario para tomar la decisión y analícela con su familia y sus amigos. Este formulario incluye un resumen de la información que los investigadores analizarán con usted. Si usted decide participar en el estudio, usted recibirá una copia de este formulario. Por favor, haga todas las preguntas o inquietudes que tenga sobre el estudio.

2. ¿Por qué se está realizando este estudio de investigación?

La Enfermedad de Huntington (HD) afecta a las personas de todas las razas alrededor del mundo; produce movimientos involuntarios e incontrolables de las extremidades superiores, inferiores y una degeneración neurológica progresiva lo que conduce a la demencia y muerte del paciente.

En esta enfermedad los síntomas son causados por una disminución del número de células en un área del cerebro. Este daño celular afecta a la habilidad cognitiva (pensamiento, juicio y memoria), movimientos y control emocional. Los síntomas aparecen gradualmente, usualmente en los individuos adultos jóvenes, pero también hay la presencia de esta enfermedad en niños y adolescentes. En la mayoría de los casos, las personas con este desorden genético pueden mantener su independencia después de algunos años que aparecen los primeros síntomas; pero con el tiempo el deterioro de esta enfermedad es evidente, hasta llegar a la dependencia absoluta, demencia y muerte del individuo

En el Ecuador es importante conocer, determinar y corroborar la presencia de esta enfermedad; ya que en el Ministerio de Salud Pública (MSP) del Ecuador no existen datos. La contribución potencial para la academia y las diferentes unidades medicas que componen el sistema de salud pública del país y el Ministerio de Salud Pública es obtener y determinar en una primera instancia datos epidemiológicos y

clínicos (origen racial, edad, sexo, educación, estatus marital, altura, peso, índice de masa corporal, presión sanguínea;) que aportaran al diagnóstico y conocimiento de la enfermedad de Huntington en el País. En la segunda fase se realizará un diagnóstico genético molecular con muestras de sangre.

Conjuntamente se intentara crear redes con los diferentes profesionales especialistas, en donde se trabajará y capacitará a estudiantes Ecuatorianos de pregrado y postgrado con el propósito de realizar transferencia de tecnologías y movilidad de personal con el propósito de que se continúe realizando tareas de investigación es esta enfermedad.

3. ¿Hay algún beneficio por participar en el estudio?

Si usted participa en esta investigación, obtendrá un resultado fiable y certero de su diagnóstico de la enfermedad; por otro lado puede que no haya otro beneficio, es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a nuestra investigación. El proyecto no ayudará al paciente ni familiares con posibles problemas psicológicos ni en el tratamiento de la enfermedad.

4. ¿Cuántas personas participarán en el estudio?

Invitamos a participar a todos los adultos (30-55 años) y Jóvenes (menores a 20 años, cuya edad mínima de elegibilidad es 1 año) con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Huntington los cuales son atendidos en diferentes unidades operativas de salud pública y privada del Ecuador. Se estima trabajar con 300 pacientes.

5. ¿En qué consiste el estudio?

Se procederá de la siguiente manera para la realización de este estudio:

- a.- Lectura y explicación del consentimiento informado a individuos que participen en el proyecto.
- b.- Obtención de una muestra de sangre de uno de sus dedos usando una lanceta y se depositara Cuatro gotas de sangre en un papel filtro.
- c.- Con las muestras de sangre seca impregnada en papel filtro, se realizará una técnica de laboratorio para extraer y aislar material genético de cada paciente.
- d.- Por medio de una técnica específica de laboratorio que se realizará; en la cual básicamente, de la muestra sanguínea se extraerá y aislará el material genético (ADN – ácido desoxirribonucleico, que contiene toda la información de genes usados en el desarrollo y funcionamiento de organismos vivos). Para realizar este procedimiento de obtención de genes; se utilizará reactivos químicos, los cuales facilitarán la extracción y aislamiento de dicho material.
- e.- Se conocerá la secuencia del material genético extraído y aislado de los participantes.

Descripción del proceso:

El médico neurólogo obtendrá la muestra de sangre del paciente, o lo derivará al investigador para obtención de la misma, se extraerá la sangre con una lanceta en el dedo índice o pulgar de la mano o el talón (dependiendo si es bebe o pacientes jóvenes y adultos que por la enfermedad la extracción de la muestra sanguínea sea muy complicada). La cantidad de sangre que se necesita por cada paciente para el estudio son cuatro gotas de sangre total, lo que es equivalente a 200 µl ó 0.2 ml. Al final de la investigación, la muestra de sangre que se recolectó en un papel filtro será almacenado con el propósito de una futura y posible repetición de la prueba; el tiempo de almacenaje es de 1 año a una temperatura de 17 a 26°C, humedad relativa de 40 a 65%, evitando la exposición a luz solar y a cualquier solvente orgánico e inorgánico.

6. ¿Cuánto tiempo durará mi participación en el estudio?

La investigación durará 9 meses en total. En donde el médico Neurólogo le informará a usted después de un mes de la toma de muestra, el resultado obtenido por nuestro análisis realizado en el laboratorio de investigación.

Se realizará una primera visita en donde se obtendrá la muestra sanguínea, o a su vez el médico neurólogo obtendrá la muestra, previa firma del consentimiento informado.

7. ¿Cuáles son los riesgos de participar en este estudio?

Dolor en el sitio de la extracción de sangre; la confirmación del diagnóstico podría ocasionar depresión ó estrés al paciente y los familiares. Es importante indicar que el proyecto no realizará ningún acompañamiento o remisión al paciente o la familia en caso de que se confirme el diagnóstico.

8. ¿La información o muestras que doy son confidenciales?

Los investigadores no revelarán la identidad de aquellos que participen en la investigación. La información que será recopilada por el proyecto de investigación será manejada con absoluta confidencialidad por los investigadores. Cualquier información acerca del paciente tendrá un código en el envés de su nombre y en la base de datos.

El conocimiento que obtengamos por realizar esta investigación se compartirá con el paciente antes que se haga disponible al público. No se compartirá información confidencial. Si el paciente lo desea, se podrá realizar encuentros con sus familiares y allegados. Después de estos encuentros, se publicarán los resultados para que otras personas interesadas puedan aprender de nuestra investigación.

La información obtenida tendrán acceso los pacientes, familiares, el investigador principal y co-investigadores, becarios.

Las muestras sanguíneas obtenidas de los pacientes, se colocarán en un papel filtro que al secarse el material biológico se almacenará en el laboratorio donde se realizarán las pruebas genéticas.

La información obtenida del estudio estará en una computadora con un código; así como también los consentimientos informados y otros documentos impresos estarán en un archivador con llave.

El Comité de Bioética podrá tener acceso a los expedientes en caso de necesidad por problemas de seguridad o ética en el estudio

9. ¿Qué otras opciones tengo?

Usted no está obligado en participar en la investigación si no desea hacerlo. Además puede dejar de participar en cualquier momento. Es su elección y todos sus derechos serán respetados.

10. ¿Cuáles son los costos del estudio de investigación?

Los participantes involucrados en el proyecto, no incurrirán en gastos.

11. ¿Me pagarán por participar en el estudio?

Usted no recibirá ningún pago por participar en este estudio.

12. ¿Cuáles son mis derechos como participante de este estudio?

Es su elección participar o no en la investigación; todos sus derechos serán respetados. No habrá sanciones ni pérdida de beneficios si usted decide no participar o decide retirarse del estudio antes de su conclusión. Usted puede dejar de participar en cualquier momento.

13. ¿A quién debo llamar si tengo preguntas o problemas?

Si el paciente tiene alguna pregunta, se le invitará a formularla en cualquier momento del proceso, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas más tarde puede contactar a:

Rolando Avilés-Reyes, PhD
Av. 12 de Octubre 1076 y calle Roca
Télf: 2991700 ext 1052
email:roavilesreyes@gmail.com; RAVILES759@puce.edu.ec

Si tiene preguntas sobre el consentimiento informado usted también puede contactar a Dr. William F. Waters, Presidente del Comité de Bioética de la USFQ, al teléfono 02-297-1775 o por correo electrónico a: comitebioetica@usfq.edu.ec

14. El consentimiento informado

He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir un poco de dolor en la obtención de la muestra sanguínea. Sé que puede que no haya beneficios para mi persona y que no se me recompensara económicamente. Si necesito información de mis resultados, se me ha proporcionado los datos del Investigador para contactarlo con facilidad.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente a las preguntas que he realizado, consiento voluntariamente participaré en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en ninguna a mi cuidado médico. Además autorizo a uso de los datos clínicos y epidemiológicos de la historia clínica personal que se encuentra en los archivos internos del

Código: 2012-23

hospital. Acepto voluntariamente el participar en este estudio de investigación. Me han entregado una copia del este formulario de consentimiento informado.
Autorizo a mis familiares a tener acceso a la información que se obtendrá en este estudio siempre y cuando mis condiciones físicas o mentales me impidan.

Firma del participante o representante legal

Fecha

Nombre y firma del investigador que obtiene el consentimiento

Firma del testigo (si es que aplica)

Firma paciente adolescente

Firma representante legal paciente adolescente

Datos de identificación de familiares autorizados a tener acceso a la información:

Nombre

Teléfono domicilio

Teléfono oficina

Teléfono Celular

Teléfono donde se pueda contactar

Correo electrónico

Dirección postal

BIBLIOGRAFÍA

- Apuntes de neuroanatomía.* (s.f.). Recuperado el 29 de ABRIL de 2012, de http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/10_cerebro_interno_archivos/Page414.htm
- Bates G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's diseases. *Lancet*, 1642-1644.
- Benítez, J. (1999). Implicaciones clínicas y genéticas de las mutaciones dinámicas en clínica neuropediátrica. *Revista de Neurología*, 60-63.
- Benítez-Barrueco, A. (2002). Enfermedad de Huntington: fundamentos moleculares e implicaciones para una caracterización de los mecanismos neuronales responsables del procesamiento lingüístico. *REV NEUROL*, 75-76.
- Bioquibi. (2010). *Bioquibi.webs.ull.es*. Recuperado el 17 de ENERO de 2013, de Bioquibi: <http://bioquibi.webs.ull.es/bioquimica%20estructural/Archivoszip/leccion5-4.pdf>
- Cattaneo E, Z. C. (2005). Normal huntingtin function: an alternative. *Nat Rev Neurosci*, 919-930.
- Christian Landles & Gillian P.Bates. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO reports*, 958-963.
- Christopher A. Ross, R. I. (2002). Huntington disease. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, 1817-1820.
- Ersoy, N. (2007). Molecular genetics of Huntington's Disease: When size does matter. *Haliç University, Department of Molecular Biology and Genetics, Istanbul, Turkey*, pag 2.
- García, D. S. (2011). Imitadores de la enfermedad de Huntington: síndromes Huntington-like y otras fenocopias. *Revista española de trastornos del movimiento*, 4-9.
- George Huntington, M. (1872). ON CHOREA. *the medical and surgical reporter*, 317-321.
- Group, T. H. (1993). A novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded And Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell Press*, 971-983.
- Haines, D. E. (2003). *Principios de neurociencia*. España, Barcelona: ELSEVIER.
- Hernán Vélez A, W. R. (2002). *Fundamentos en medicina, neurología*. Medellín: Corporación para investigaciones biológicas.
- Hughes, Donald C. Lo and Robert E. (2010). *Neurobiology of Huntington's Disease*. California: Boca raton.

- I, S., & Sharon R, W. J. (2010). Huntington disease demetia. *Medscape*.
- I. Tasset, F. S. (2009). Bases moleculares de la enfermedad de Huntington: papel del estres oxidativo. *NEUROL*, 424-225.
- Irene Paradisi, A. H. (2007). Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset haplotype analyses and geographic aggregation. *The Japan Society of Human Genetics and Springer*, 127-135.
- Itxaso., D. M. (FEBRERO de 1997). *UNINET*. Recuperado el 16 de FEBRERO de 2012, de FUNDAMENTOS DE LA BIOÉTICA Y NECESIDADES ACTUALES: <http://www.uninet.edu/bioetica/elosegui.pdf>
- Iván Peñuelasa, C. d. (1997). Expansión de tripletes repetidos en enfermedades neurodegenerativas hereditarias. *Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular y Genética Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.*, 544-545.
- J.A.Burguera, P. A. (1997). Estimación de la prevalencia de la enfermedad de Huntington por el método de captura-recaptura en la Comunidad Valenciana. *Neurología*, 1845-1847.
- J.C. Arango-Lasprilla, J. I.-D. (2003). Características clínicas y neuropsicológicas de la enfermedad de Huntington: una revisión. *Revista de Neurología*, 758-765.
- Leite, J. F. (2001). La enfermedad de Huntington: una visión biomolecular. *REVISTA DE NEUROLOGÍA*, 762-767.
- M.P-Gimenez., S.-R. y. (2006). Recursos humanos e instrumentales en un laboratorio toxicológico forense. *Instituto nacional de toxicología y ciencias forenses*, 3-5.
- Melissa Vásquez-Cerdas, F. M.-M.-M.-C.-T.-B. (2008). Diagnóstico molecular de la Enfermedad de Huntington en Costa Rica. 35-40.
- Molón, L. R., Sáez, R. Y., & Alcocer, M. L.-I. (2010). Juvenile Huntingtons disease: a case report and literature review. *Actas Esp Psiquiatr*, 285-294.
- Neurología*. (2010). Recuperado el 29 de ABRIL de 2012, de Anatomía y fisiología del sistema nervioso: <http://www.iqb.es/neurologia/a004.htm>
- Potter Nt, S. E. (2004). Technical standars and guildelines for Huntington disease testing. *Genet Med*, 6:61-65.
- Roos, R. A. (2013). *Huntington's disease: a clinical review*. Recuperado el 17 de Junio de 2013, de Roos Orphanet Journal of Rare Disease: www.ojrd.com/content/5/1/40
- Rubio JC, M. M. (1998). Déficit de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial. *REVISTA DE NEURLOGIA*, 15-20.

Sheila A Simpson, M. J. (1993). Huntington's disease in Grampian region: correlation of the CAG repeat number and the age of onset of the disease. *PUBMED*, 1014-1016.

Thompson, T. &. (2008). *Genética en Medicina*. España: Masson.

UNESCO. (22 de 03 de 2012). *UNESCO*. Recuperado el 22 de 03 de 2012, de UNESCO: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001461/146180s.pdf>

UNNE. (2010). *Universidad Nacional del Nordeste*. Recuperado el 21 de enero de 2013, de Universidad Nacional del Nordeste: http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/expresion.htm#_Toc20813394

Wexler et al. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *The National Academy of Sciences of the USA*, 3498-3503.