

# Diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington

Mónica Alejandra Rosales-Reynoso y Patricio Barros-Núñez\*

División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jal., México

Recibido en su versión modificada: 17 de septiembre de 2007

— Aceptado: 14 de diciembre de 2007

## RESUMEN

La enfermedad de Huntington es un padecimiento neurológico degenerativo, de herencia autosómica dominante, causado por una expansión CAG que codifica una secuencia de poliglutamina en la proteína huntingtina. Su frecuencia varía de cinco a 10 afectados por 100 mil individuos en población caucásica. Clínicamente muestra manifestaciones motoras, cognitivas, psicológicas y muerte en 10 a 15 años. Avances concretos se han logrado en el conocimiento del mecanismo mutacional, alteraciones del producto proteico y su efecto neuropatológico. Un conjunto de procedimientos como PCR con o sin modificación del ADN, Southern blot y métodos mixtos son analizados en sus características y eficiencia para el diagnóstico molecular de esta enfermedad.

### Palabras clave:

Enfermedad de Huntington, huntingtina, poliglutamina, CAG, diagnóstico molecular

## SUMMARY

Huntington's disease (HD) is a neurological degenerative disorder, inherited by an autosomal dominant mode, and caused by a CAG triplet expansion coding for a poly-glutamine sequence in the huntingtin protein. HD affects 5-10 in 100 000 individuals from Caucasian population. Clinically patients display motor, cognitive and psychological impairment, and death within 10-15 years. Concrete advances have been achieved in the knowledge of the mutational mechanism, alteration of the protein product and their neuropathological effects. A number of tests such as PCR with or without DNA modification, Southern blot and mixed methods are analyzed. We describe their characteristics and effectiveness for the molecular diagnosis of HD.

### Key words:

Huntington's disease, huntingtin, polyglutamine, CAG, molecular diagnosis

## Introducción

Descrita por primera vez en 1872 por George Huntington, es un padecimiento neurológico degenerativo que se hereda en forma autosómica dominante. La enfermedad de Huntington, también conocida como corea (del griego danza) por los movimientos característicos que realizan los pacientes, muestra diferentes frecuencias en las diversas regiones del mundo; se informa que en algunas poblaciones el número de personas afectadas es de cinco a 10 por cada 100 mil habitantes, con igual incidencia en ambos sexos.<sup>1</sup>

Los síntomas aparecen generalmente hacia la cuarta o quinta década de la vida. Las manifestaciones más importantes son movimientos involuntarios incontrolados, alteraciones psicológicas y conductuales, y pérdida de las funciones intelectuales (demencia). Las manifestaciones más tempranas suelen ser los movimientos coreiformes involuntarios en cara, manos y hombros, los cuales suelen preceder a la demencia y rara vez faltan cuando la enfermedad está

muy avanzada. La expresión de la enfermedad, en general, es muy variable.

En la llamada forma juvenil, las primeras manifestaciones aparecen antes de los 20 años de edad, en tanto que en la forma infantil los síntomas inician antes de los 10 años; juntas representan 5 a 12% de los pacientes con enfermedad de Huntington. Clínicamente, el comportamiento de la forma de inicio temprano es diferente a la forma adulta clásica. Los pacientes con inicio juvenil o infantil muestran predominio de rigidez-acinesia con movimientos coreicos menos prominentes, demencia temprana, epilepsia, mioclonus y temblor en el transcurso de su padecimiento.<sup>1,2</sup>

Los estudios de laboratorio muestran aumento en la creatinina urinaria. El electroencefalograma muestra actividad de punta de onda de 4 a 5 Hz de alta-amplitud, con dominancia occipital. La tomografía axial computarizada y la resonancia magnética de cráneo muestran dilatación de los cuernos frontales de los ventrículos laterales, con atrofia del núcleo caudado y el putamen, así como de los surcos de la convexidad cerebral, predominantemente a nivel frontal.<sup>2</sup>

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Patricio Barros-Núñez. División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Sierra Mojada 800, Col. Independencia, 44340 Guadalajara, Jal., México. Tel.: (33) 3668 3000, extensión 31929. Correo electrónico: pbarros\_gdl@yahoo.com.mx

## Neuropatología

La lesión causada por la enfermedad se restringe fundamentalmente a atrofia del cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen) y en menor medida de otras áreas corticales, aunque microscópicamente todo el cerebro puede mostrar ligera atrofia. El cuerpo estriado, como parte del sistema motor subcortical de los ganglios basales, envía señales a la corteza cerebral a través del tálamo; este sistema está constituido además por el núcleo subtalámico, globo pálido y sustancia negra (*pars compacta* y *pars reticulata*), y participa fundamentalmente en el control del movimiento. Microscópicamente, la patología estriatal se caracteriza por pérdida neuronal, gliosis y agregados proteicos. Las neuronas más afectadas son las neuronas espinosas de tamaño medio, que constituyen 95% de las neuronas estriatales. Las neuronas espinosas de tamaño medio utilizan GABA como neurotransmisor y proyectan al globo pálido y a la sustancia negra; sus cuerpos celulares reciben un gran número de señales como las glutamérgicas de la corteza y del tálamo, colinérgicas de las interneuronas colindantes, gabérgicas de las neuronas espinosas de tamaño medio adyacentes, y dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra. Las señales dopaminérgicas modulan la transmisión desde la corteza cerebral al estriado. La acción de la dopamina sobre las neuronas estriatales depende del tipo de receptor de dopamina acoplado a las proteínas G que tengan. Los receptores D1 y D5 estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y pueden potenciar los efectos de las proyecciones corticales sobre las neuronas estriatales.<sup>2</sup>

En el cerebro con enfermedad de Huntington, las neuronas estriatales y corticales (neocortical y allocortical) contienen inclusiones intraneuronales nucleares características que raramente están presentes en otras estructuras subcorticales como el globo pálido y el tálamo, y generalmente están ausentes en otras partes del cerebro. Las inclusiones intraneuronales nucleares son inmunorreactivas a anticuerpos contra la región N-terminal de la huntingtina (pero no a la región C-terminal) y contra la ubiquitina. Existen también agregados similares presentes en el neuropilo, llamados "agregados del neuropilo" o "neuritas distróficas". Mediante análisis de electrotransferencia e inmunodetección de fracciones nucleares del estriado y la corteza de pacientes con enfermedad de Huntington, se observó que los agregados nucleares y del neuropilo estaban formados por un fragmento de huntingtina N-terminal de 40 kDa. Las inclusiones intraneuronales nucleares son más frecuentes en la corteza que en el estriado en todos los grados patológicos de enfermedad de Huntington, así como más comunes en los jóvenes que en los adultos.<sup>1,2</sup>

## Mecanismo mutacional

La mutación que causa la enfermedad de Huntington es una expansión de repeticiones CAG cerca del extremo 5' en el gen de la huntingtina (HD) (4p16.3). Adyacente se encuentra otra secuencia que oscila entre siete y 12 repeticiones CCG, la cual

codifica para prolina, y otra que consiste de dos a tres repetidos CCT. El gen HD está formado por 67 exones dentro de una secuencia génica de 170 kb y da lugar a una proteína de 348 kDa llamada huntingtina. La secuencia de repeticiones CAG se traduce en regiones de poliglutamina, en el residuo 17 cerca del extremo N-terminal. La proteína mutante se traduce y expresa en forma ubicua en el sistema nervioso central. La secuencia repetitiva CAG es polimórfica entre la población normal; varía entre 11 y 35 repeticiones, pero 99% de los casos presenta menos de 30. Los alelos mutados muestran entre 36 y 121 repeticiones CAG. Recientemente, el *Laboratory Committee by the Huntington Disease Working Group*, en Bethesda, Maryland, propuso la siguiente clasificación:

1. *Alelos normales*: alelos con  $\leq 26$  repeticiones CAG, no son patológicos y segregan como repeticiones polimórficas estables en >99% de las meiosis. Los alelos más comunes son los de 17 y 19 repeticiones CAG.
2. *Alelos normal-mutados*: alelos con 27 a 35 repeticiones CAG, intervalo referido como rango de inestabilidad meiótica o alelos intermedios. No producen el fenotipo de la enfermedad de Huntington pero pueden ser meióticamente inestables en las células germinales masculinas.
3. *Alelos HD con penetrancia reducida*: alelos con 36 a 39 repeticiones, meióticamente inestables y que pueden producir la enfermedad de Huntington.
4. *Alelos HD con penetrancia completa*: tienen más de 40 repeticiones CAG y producen el fenotipo de la enfermedad de Huntington.
5. *Mosaicismo*: se debe a la inestabilidad mitótica y meiótica, y se ha descrito en cerebro y células germinales masculinas, además, parece ser más pronunciado en los casos de inicio juvenil asociados con grandes expansiones.<sup>3</sup>

## Huntingtina

Se expresa en todas las células humanas y de mamíferos, con altas concentraciones en cerebro y testículos y cantidades moderadas en hígado, corazón y pulmón. Se han identificado numerosos ortólogos presentes en diferentes especies, que incluyen a *Zebrafish*, *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*. El papel que desempeña la proteína de tipo silvestre aún no está bien entendido. A pesar de su gran tamaño, ha sido difícil establecer la función normal de la huntingtina debido a que contiene muy poca homología con otras proteínas; se sabe que se expresa constitutivamente y que se localiza en todos los compartimientos subcelulares, donde se asocia con organelos como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias. Se ha demostrado que la huntingtina forma parte del complejo dinactina, co-localizando en microtúbulos e interactuando directamente con la tubulina- $\beta$ , lo cual sugiere un papel en el transporte vesicular o en el anclaje del citoesqueleto. Interesantemente se ha demostrado que la proteína también tiene un papel en la endocitosis mediada por clatrina, en el transporte neuronal y en la señalización postsináptica; además, protege a las células neuronales del estrés apoptótico y, por lo tanto, puede participar como factor pro supervivencia.<sup>2</sup>

El exceso de poliglutamina al parecer induce cambios conformacionales en la huntingtina de individuos afectados, formando agregados intracelulares, que en la mayoría de los casos se manifiestan como inclusiones intranucleares. Múltiples investigaciones han sido llevadas a cabo para determinar la función y efecto patológico de la poliglutamina; todas concluyen que su papel es complejo y que opera en muchos niveles celulares. Estudios recientes demuestran que la degeneración neuronal en la enfermedad resulta de un efecto combinado de ganancia de función en la forma mutada de la huntingtina, con pérdida de función del tipo silvestre.<sup>1,2</sup>

## Diagnóstico molecular

Tras el descubrimiento del gen y la proteína involucrados en la enfermedad de Huntington, se ha podido diseñar una serie de técnicas moleculares capaces de realizar el diagnóstico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) parece ser el método de primera opción para estimar el número de repeticiones CAG; aunque varios juegos de iniciadores, condiciones de amplificación, y métodos de separación han sido publicados, su utilización resulta ineficiente cuando la expansión del número de repeticiones es mayor, puesto que la región donde ocurre la mutación es rica en secuencias C+G, mismas que tienden a aparearse entre sí formando estructuras secundarias que impiden o dificultan su amplificación por la PCR convencional. Esta ineficiencia ha llevado al uso de aditivos químicos como el dimetilsulfóxido, glicerol o formamida, así como de análogos de base como el 7-deaza-dGTP que, sustituyendo al dGTP, evitan la formación de tales estructuras. Sin embargo, la utilización de dichas sustancias presenta algunos problemas: el ADN que contiene el análogo de base migra más lento que el ADN intacto, por lo que el número de repeticiones CAG puede ser sobreestimado, requiriendo de geles de poliacrilamida desnaturizantes y marcadores de peso molecular especiales para poder estimar el tamaño. Por otro lado, el ADN así amplificado resulta difícil de visualizar mediante tinciones convencionales como la de bromuro de etidio, ya que el análogo de base altera su estructura electrónica e impide su fluorescencia. Aunque se ha propuesto que sustituyendo parcialmente el análogo de base se logra amplificar y teñir secuencias de tamaño normal, existen reportes en los que se ha intentado, sin éxito, reproducir este procedimiento.<sup>4,5</sup> Algunos autores recomiendan que para la amplificación por PCR se utilice iniciadores marcados radiactivamente, para luego ser visualizados por autorradiografía. Otra alternativa para mejorar el diagnóstico es la amplificación mediante PCR usando iniciadores fluorescentes y su posterior análisis por electroforesis capilar en un secuenciador. Se han reportado también ensayos de PCR-Southern en los que para la amplificación se usa iniciadores marcados con fluoresceína-dUTP o con radiactividad, luego de lo cual el producto es transferido a un soporte para su visualización por autorradiografía.<sup>4,5</sup>

Actualmente ha sido propuesto un procedimiento basado en la modificación del ADN, donde las citosinas no metiladas son convertidas en uracilo, evitando la formación de estructuras secundarias así como la utilización de análogos de base y aditivos químicos; sin embargo, tal procedimiento parece ser aún ineficiente en el diagnóstico de la enfermedad de Huntington, ya que alelos mayores de 70 repeticiones CGG no logran amplificarse satisfactoriamente.<sup>4,6</sup>

Desde 1998, el *CAP/ACMG Biochemical and Molecular Genetics Resource Committee* ha puesto mayor atención en la eficacia de los procesos utilizados para cuantificar las repeticiones CAG. La recomendación es que los laboratorios sean capaces de determinar el tamaño de los alelos HD con la siguiente eficiencia:  $\pm 1$  repetición para alelos  $\leq 43$ ;  $\pm 2$  repeticiones para alelos entre 44 y 50;  $\pm 3$  repeticiones para alelos entre 51 y 75;  $\pm 4$  repeticiones para alelos  $>75$ .<sup>3</sup>

## Conclusiones

Cuando las estrategias metodológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Huntington utilizan PCR convencional, resulta particularmente difícil la amplificación de alelos mayores a 60 repeticiones, por lo que se requiere PCR-Southern blot. A pesar de la complejidad de esta técnica y de los potenciales riesgos cuando se usan secuencias marcadas radiactivamente, sigue siendo utilizada en todos los laboratorios que disponen de la infraestructura adecuada.

La detección de la expansión trinucleotídica responsable de la enfermedad por los métodos moleculares analizados, aunque factible, resulta aún compleja y costosa. La búsqueda de un método de diagnóstico simple, económico y seguro que permita identificar las amplificaciones de trinucleótidos y determinar con certeza el estado mutacional de los individuos afectados, así como el de sus familiares, aún no ha encontrado una respuesta adecuada en ninguno de los procedimientos revisados.

## Referencias

1. Hayden MR, Fremer B. Huntington's disease. En: Scriver CR, Sly WS, editors, *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, 8a. edition. McGraw-Hill Professional; 2000, pp. 5677-5701.
2. Landles C, Bates G. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington disease. *EMBO* 2004;5:958-963.
3. Potter NT, Spector EB, Prior TW. Technical standards and guidelines for Huntington disease testing. *Genet Med* 2004;6:61-65.
4. Valdés JM, Tagle DA, Elmer LW, Collins F. A simple non-radioactive method for diagnosis of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1993;2:633-634.
5. Panagopoulos I, Lassen C, Kristoffersson U, Aman P. A novel PCR-based approach for the detection of the Huntington disease associated trinucleotide repeat expansion. *Hum Mut* 1999;13:232-236.
6. Rosales-Reynoso MA, Alonso-Vilatela E, Macías-Ojeda R, Arce-Rivas A, Sandoval L, Troyo-Sanromán R, et al. PCR approach for detection of fragile X syndrome and Huntington disease based on modified DNA: limits and utility. *Genet Test* 2007;11:153-159.