

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN
EXACTA DE LAS REPETICIONES CAG CAUSANTES DE LA
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

Memoria que presenta para optar al grado de Doctor,
Sonia Blanco Martín

Granada, 2004

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sonia Blanco Martín
D.L.: GR.1730-2008
ISBN: 978-84-691-5236-2



**D. JOSÉ ANTONIO GÓMEZ CAPILLA,
CATEDRÁTICO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.**

CERTIFICA:

Que D^a Sonia Blanco Martín, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN EXACTA DE LAS REPETICIONES CAG CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2004

Fdo. Prof. Dr. D. J. A. Gómez Capilla



D^a. M^a ESTHER FÁREZ VIDAL, INVESTIGADORA CIENTÍFICA (FIS). INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.

CERTIFICA:

Que D^a Sonia Blanco Martín, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN EXACTA DE LAS REPETICIONES CAG CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2004

Fdo. Dra. D^a. M. E. Fárez Vidal



**D. ANTONIO SUÁREZ GARCÍA, PROFESOR
TITULAR DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.**

CERTIFICA:

Que D^ª Sonia Blanco Martín, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN EXACTA DE LAS REPETICIONES CAG CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2004

Fdo. Prof. Dr. D. A. Suárez García

ABREVIATURAS

A	Adenina
AI	Alelos intermedios
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
C	Citosina
CBP	CREB Binding Protein
cDNA	DNA complementario
CREB	<i>cAMP-Response Element Binding Protein</i>
CT	Tomografía computerizada
dATP	Desoxiadenosín trifosfato
dCTP	Desoxicitosín trifosfato
ddATP	Didesoxiadenosín trifosfato
ddCTP	Didesoxicitosín trifosfato
ddGTP	Didesoxiguanidín trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleósido trifosfato
ddTTP	Didesoxitimidín trifosfato
dGTP	Desoxiguanidín trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
dTTP	Desoxitimidín trifosfato
Dyn	Dinorfina

ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EH	Enfermedad de Huntington
Enk	Encefalina
G	Guanina
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glia
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido parte externa
Gpi	Globo pálido parte interna
HAP	<i>Huntingtin associated protein</i>
HIP	<i>Huntingtin interacting protein</i>
HIPPI	<i>HIP 1 Protein Interaction</i>
HPRT	Hipoxantina fosforribosil transferasa
HTT	Huntingtina
HYP	<i>Huntingtin Yeast Partners</i>
IIN	Inclusiones intraneuronales nucleares
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MRI	Resonancia magnética por la imagen
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSSN	Neuronas espinosas de tamaño medio

ND	Neurita distrófica
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRSE	<i>Neuron Restrictive Silencer Element</i>
Nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía de emisión de positrones
poliQ	Poliglutamina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SCA1	Ataxia espinocerebelosa tipo 1
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNpc	Sustancia negra <i>pars compacta</i>
SNpr	Sustancia negra <i>pars reticulata</i>
TAE	Tampón Tris-ácido acético-EDTA
TBP	<i>TATA Binding Protein</i> o proteína de unión a TATA
YAC	Cromosoma artificial de levadura

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Desarrollo histórico	3
1.2. Prevalencia	5
1.3. Historia natural	8
1.3.1. Edad de inicio	8
1.3.2. Síntomas iniciales	10
1.3.3. Edad de defunción	11
1.3.4. Duración de la enfermedad de Huntington	12
1.4. Neuropatología	13
1.5. Manifestaciones clínicas	16
1.5.1. Síntomas en la EH de inicio adulto	16
1.5.1.1. Síntomas motores extrapiramidales	17
1.5.1.2. Otras disfunciones motoras	18
1.5.1.3. Deterioro cognitivo	19
1.5.1.4. Trastornos psiquiátricos	21
1.5.1.5. Otros trastornos	21
1.5.2. Síntomas en la EH de inicio juvenil	22
1.5.3. Síntomas en la EH de inicio senil	23

1.7. Diagnóstico	55
1.7.1. Diagnóstico diferencial	56
1.7.2. Diagnóstico molecular	58
1.7.2.1. Diagnóstico directo: metodología	59
1.7.2.2. Diagnóstico indirecto: metodología	60
1.7.3. Diagnóstico prenatal	61
1.7.4. Consideraciones ético-legales	62
1.8. Tratamiento actual	64
1.9. Perspectivas terapéuticas	66
1.9.1. Terapia a nivel de DNA	66
1.9.2. Terapia a nivel de proteína	67
1.9.2.1. Inhibir la formación de agregados de HTT	67
1.9.2.2. Suplir el estrés oxidativo	68
1.9.2.3. Inhibición de caspasas	69
1.9.2.4. Trasplante	70
1.9.2.5. Inhibición de expresión de la HTT mutada	70
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	73
3. MATERIALES Y MÉTODOS	77
3.1. Pacientes	79
3.2. Extracción del DNA	80

ÍNDICE

3.3. Amplificación de la expansión CAG en el gen HD	80
3.4. Electroforesis capilar y detección fluorescente	84
3.4.1. Preparación de los productos amplificados	86
3.4.2. Preparación del equipo	86
3.4.3. Programación de las muestras	88
3.4.3.1. Hoja de muestras (“Sample Sheet”)	88
3.4.3.2. Lista de inyección	89
3.4.4. Análisis de los resultados	91
3.5. Secuenciación	91
3.5.1. Amplificación de los fragmentos de DNA seleccionados	92
3.5.2. Preparación del producto amplificado para secuenciación	94
3.5.2.1. Electroforesis en gel de agarosa	94
3.5.2.2. Purificación de los productos amplificados	96
3.5.3. Preparación de la reacción de secuenciación	99
3.5.3.1. Eliminación de los didesoxinucleótidos libres	101
3.5.4. Electroforesis capilar	103
3.5.4.1. Preparación del equipo	103
3.5.4.2. Programación de las muestras	105
3.5.4.3. Análisis de los resultados	106
4. RESULTADOS	107
4.1. Amplificación de la expansión CAG	109

4.2. Secuenciación	127
4.3. Pacientes	129
5. DISCUSIÓN	135
6. CONCLUSIONES	149
7. BIBLIOGRAFÍA	153

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESARROLLO HISTÓRICO

En 1872, un médico llamado George Huntington describió una enfermedad caracterizada por intensos movimientos involuntarios, con comienzo en la edad media de la vida y patrón hereditario autosómico dominante (Huntington, 1872). A continuación se cita un extracto del original de la publicación:

“La corea hereditaria como yo la he llamado está confinada a determinadas y afortunadamente pocas familias y ha sido transmitida como una reliquia de generaciones olvidadas en el confuso pasado. Aquellos por cuyas venas corre la semilla de la enfermedad viven con el temor y no es mencionada salvo extrema necesidad como “ese trastorno”. Presenta todos los síntomas de la corea común pero de una forma más severa, se manifiesta en la edad adulta a una edad mediana y comienza de una forma gradual pero segura, empeora paso a paso y con frecuencia el curso de la enfermedad abarca años hasta el trágico desenlace pero ... Hay tres peculiaridades principales de esta enfermedad: 1) su naturaleza hereditaria, 2) una tendencia a la locura y al suicidio, y 3) su manifestación como una enfermedad grave en la edad adulta.

INTRODUCCIÓN

1. *De su naturaleza hereditaria. Cuando uno o ambos padres presentan manifestaciones de esta enfermedad, y más especialmente cuando estas manifestaciones fueron de naturaleza seria, uno o más miembros de la descendencia casi invariablemente sufrirá la enfermedad en su edad adulta. Pero si por suerte uno de los hijos no la padece a lo largo de su vida, el hilo se rompe y los nietos y bisnietos del paciente original pueden descansar seguros de que están libres de la enfermedad...*

2. *La tendencia a la locura y algunas veces el tipo de demencia que conduce al suicidio es característica. Conozco muchos casos de suicidios en pacientes con este tipo de corea, o en personas que pertenecieron a familias donde existió esta enfermedad...*

3. *La tercera peculiaridad es que comienza como una grave enfermedad solo en la edad adulta. No conozco ni un solo caso que mostrara los síntomas principales de la corea antes de los treinta o cuarenta años mientras que aquellas personas que pasan los cuarenta años sin síntomas de la enfermedad raramente la sufrirán... No conozco ninguna recuperación o mejora de los síntomas en una corea de este tipo; una vez iniciada conlleva inexorablemente al amargo final. No existe tratamiento hoy en día, el final es tan bien conocido por el paciente y sus amigos que el consejo médico raramente se busca. Parece ser una de las incurables."*

Para honrar a este médico, los científicos le dieron su nombre a esta enfermedad: Corea de Huntington o Enfermedad de Huntington (EH).

1.2. PREVALENCIA

Existen estudios epidemiológicos llevados a cabo en distintas partes del mundo, incluidos noroeste de Europa, Reino Unido, Escandinavia, Norteamérica, Australia, Japón, y Sudáfrica. La frecuencia media de la EH en la población descendiente de Europa occidental es de 3 a 7 individuos afectados por 100.000 habitantes (Evers-Kiebooms *et al.*, 2002). Sin embargo, hay pequeñas áreas de prevalencia particularmente alta o baja.

Áreas de baja prevalencia. La EH no es muy común en Japón (Kishimoto K *et al.*, 1957) ni entre la raza negra africana (Hayden *et al.*, 1980). La frecuencia de EH en Japón ha sido estimada entre 0,1 y 0,38 por 100.000, que está justo por debajo de la frecuencia de Finlandia que es 0,5 por 100.000 (Palo *et al.*, 1987). Esta frecuencia es 10 a 20 veces menor que la encontrada en los países occidentales. Un amplio estudio realizado en Sudáfrica revela que la enfermedad es aproximadamente 40 veces menos frecuente en la raza negra africana que en la raza blanca de Sudáfrica. Antiguos estudios de los Estados Unidos (Reed *et al.*, 1958; Kurtzke *et al.*, 1977) también demuestran que esta enfermedad fue aproximadamente tres veces menos frecuente en los americanos de raza negra que en los de raza blanca. No obstante, un estudio más detallado de Folstein *et al*

INTRODUCCIÓN

(1987) reveló la existencia de una prevalencia en la raza negra bastante similar a la observada en la raza blanca en el estado de Maryland.

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

Áreas de alta prevalencia. La prevalencia de la EH es mayor de 15 por 100.000 en 5 áreas. Un factor importante a considerar cuando se fijan prevalencias en una región es el tamaño total de la población examinada. En una población pequeña, la presencia de unos pocos individuos afectados aumentará la prevalencia.

Esto es obvio en el estudio realizado en el área de Moray Firth, Escocia, donde un total de 5 individuos afectados resultó en una prevalencia de 560 por 100.000 porque el total de habitantes en esta región era inferior a 1.000. De igual manera, se encontró una prevalencia alta falsa en Mauritius (Hayden, 1979).

La frecuencia más alta de EH en el mundo se encuentra en el Lago Maracaibo, Venezuela (Avila-Giron, 1973; Young *et al.*, 1986). El defecto genético fue introducido por un individuo en una comunidad aislada a principios del siglo diecinueve, y se propagó rápidamente como resultado de la relación entre personas afectadas en esta área aislada.

Esta población ha ofrecido la extraordinaria posibilidad de estudiar la historia natural de esta enfermedad así como la comprensión de las características clínicas de la homocigosis en la EH (Wexler *et al.*, 1987). La identificación de esta familia extensa con EH sirvió para confirmar el ligamiento del gen HD a un marcador genético en el brazo corto del cromosoma 4. Además, esta familia ha servido como referencia de estudios de mapeo genético.

La alta frecuencia de la EH en Tasmania (Pridmore, 1990) refleja la introducción del defecto genético por un único ancestro de Somerset, Inglaterra, quien después de enviudar por segunda vez emigró con sus trece hijos a Australia. En 1964 había 120 afectados en cinco generaciones de Tasmania. El estudio de Pridmore (1990) reveló que esta familia era todavía el factor principal de la alta prevalencia de EH en Tasmania.

3. HISTORIA NATURAL

1.3.1. EDAD DE INICIO

Se define edad de inicio como la primera vez que aparecen los síntomas neurológicos o psiquiátricos dando lugar a un cambio permanente del estado normal. No obstante, con esta interpretación la estimación de la edad de inicio puede ser muy difícil. Los médicos rara vez presencian las primeras señales y síntomas de la EH, y la valoración de estos primeros cambios son observados por el paciente o su familia. En algunas familias, el rechazo a la EH les hace negar los primeros síntomas y sólo reconocen la presencia de la enfermedad en su forma más avanzada, mientras que, en otras, cualquier inquietud o torpeza se atribuye al comienzo de la enfermedad. En cualquier situación, la edad de inicio está mal calculada.

Diferentes estudios han demostrado una marcada variación en la edad de inicio debido a los diferentes criterios aplicados para su determinación, por ejemplo, inicio de síntomas psiquiátricos o corea como desencadenantes. También debido a la omisión de intervalos de observación, que pueden dar edades de inicio más bajas falsas, por no contener información de heterocigotos

asintomáticos que todavía no hubieran manifestado la enfermedad en el periodo estudiado (Newcombe, 1981).

La edad a la que comienzan los síntomas de la EH tiene una distribución normal, con una media alrededor de 40 años y una desviación estándar de 10 años aproximadamente (Hayden, 1981; Adams, 1988). La edad de inicio más temprana ha sido aproximadamente 2 años. También se han detectado pacientes con una edad de inicio de 70 e incluso 80 años.

Para corregir el problema de la omisión de intervalos de observación, Wendt *et al.* (1959) restringió sus análisis a cohortes con una edad de 60 años e informó de una media de edad de inicio de 43,97 años, que es más alta que en otros estudios. Cuando el estudio de Newcombe (1981) se amplió a personas nacidas antes de 1909, la media de la edad de inicio fue de 48,4 años. De tal forma que se observa una disminución sucesiva de la edad de inicio a medida que se reduce el intervalo de observación. De forma similar ocurre en el estudio de Adams *et al.* (1988) donde la edad de inicio media en una muestra de 611 pacientes fue de 38,6 años. Sin embargo, la restricción de los análisis a personas nacidas en 1920 resultó en una media para la edad de inicio de 43,7 años.

INTRODUCCIÓN

Por lo tanto, la edad de inicio media en la mayoría de los estudios (Hayden 1981, Harper 1991) podría haber sido subestimada como resultado del efecto de omisión de los intervalos de observación.

1.3.2. SÍNTOMAS INICIALES

La EH no tiene una señal o síntoma único. En las fases más tempranas, hay un deterioro insidioso y lento de las funciones intelectuales, así como un cambio leve de conducta. Para obtener una evaluación acertada de las señales y síntomas de la EH, es necesario seguir una cohorte durante un periodo prolongado. El estudio longitudinal de familias en Venezuela (Penney *et al.*, 1990) ha demostrado claramente que los pacientes pasan por una fase prodrómica que comprende desde la fase normal presintomática hasta el momento en que el diagnóstico puede ser obtenido tras una exploración neurológica. Esta fase de inicio durante la cual el diagnóstico de la EH es inequívoco se puede demostrar, frecuentemente, mediante una tomografía de emisión de positrones (PET) que pone de manifiesto los cambios de niveles de glucosa en el núcleo caudado (Hayden *et al.*, 1987; Grafton *et al.*, 1990).

1.3.3. EDAD DE DEFUNCIÓN

Mientras que la edad de defunción es un punto específico, un estudio de la media en una población podría tener los mismos problemas que los observados para la edad de inicio, por ejemplo, la evaluación de una cohorte reciente podría no incluir aquellos supervivientes más longevos.

La edad media de defunción en diferentes estudios varía de 51,4 (Brothers, 1964) a 61,8 años (Pridmore, 1990). En todos los casos, en los estudios donde la edad de defunción es baja la edad de inicio también es baja, hecho que refleja que no hay variación en la duración de la enfermedad. La edad media de defunción en Tasmania es de 48,3 años. El estudio más extenso realizado sobre la mortalidad y sus causas en EH está basado en los datos nacionales proporcionados por el Centro de Estadísticas de Salud de los Estados Unidos que recoge todas las causas de fallecimiento en certificados de defunción (Lanska *et al.*, 1988). En este estudio de 3058 personas, la edad media de defunción fue de 56,5 años. Las principales causas de fallecimiento en personas con EH fueron neumonía (33%) y enfermedad coronaria (24%) (Lanska *et al.*, 1988; Haines *et al.*, 1986). El suicidio representa solo el 1-3% de los fallecimientos pero es probable que no sean informados todos. Si asumimos una muerte por suicidio, los casos de envenenamiento accidental o violencia, esto se consideraría como un 8% de las muertes aproximadamente. La neumonía es

INTRODUCCIÓN

cinco veces más común en la EH que en los casos controles y probablemente es secundaria a la disfagia que resulta en asfixia y neumonía por aspiración.

1.3.4. DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La duración de la EH se estima por substracción de la edad de inicio y la edad de defunción. En contraposición a las considerables diferencias en la edad de inicio y edad de defunción en diferentes estudios, no hay variaciones significativas en la duración de la enfermedad, la cual se encuentra alrededor de 15 años, sin diferencia entre los sexos (Hayden, 1981). La supervivencia con la EH pasados los 50 años no tiene cambios significativos, lo que refleja el fracaso de la terapia médica para retardar el progreso de la enfermedad. Aunque la duración media en muchos estudios ha sido constante, hay variaciones individuales notables, como una duración de la enfermedad de 40 años en raras ocasiones (Wendt *et al.*, 1959). Los factores responsables de esta larga supervivencia son desconocidos.

1.4. NEUROPATOLOGÍA

La neuropatología es extremadamente restringida, de modo que se produce fundamentalmente una atrofia del estriado (núcleo caudado y putamen) y en menor medida de la corteza, aunque macroscópicamente todo el cerebro se presenta a menudo atrofiado (Vonsattel *et al.*, 1985).

El estriado se localiza en el cerebro anterior y pertenece al sistema motor subcortical de los ganglios basales, que manda señales a la corteza cerebral a través del tálamo. Este sistema está formado por el estriado, el núcleo subtalámico, el globo pálido (segmentos interno GPi y externo GPe) y la sustancia negra (*pars compacta* SNpc y *pars reticulata* SNpr), además de participar fundamentalmente en el control del movimiento (Afifi, 1994).

Microscópicamente, la patología del estriado se caracteriza por pérdida neuronal, gliosis y presencia de agregados protéicos (Vonsattel *et al.*, 1985; DiFiglia *et al.*, 1997). Las neuronas más afectadas son las neuronas espinosas de tamaño medio (MSSN), que constituyen el 95% de las neuronas del estriado, mientras que el resto no se afecta por la patología (Lange *et al.*, 1976). Las MSSN utilizan GABA como neurotransmisor y proyectan al globo pálido (GP) y a la sustancia negra (SN) (Graybiel *et al.*, 1994). Localizados en la matriz del estriado, sus cuerpos celulares reciben un gran número de señales, como las

INTRODUCCIÓN

glutaminérgicas de la corteza y del tálamo, colinérgicas de las interneuronas colindantes, gabérgicas de MSSN adyacentes, y dopaminérgicas, que proceden de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) (Flaherty *et al.*, 1993). Las señales dopaminérgicas modulan la transmisión desde la corteza cerebral al estriado. La acción de la dopamina sobre las neuronas del estriado depende del tipo de receptor de dopamina acoplado a proteínas G que tengan. Los receptores tipo D₁ y D₅ estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y pueden potenciar los efectos de las proyecciones corticales sobre las neuronas del estriado. Por su parte, los D₂, D₃, y D₄ inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y pueden tener efectos opuestos a los de las proyecciones de la corteza (Strange, 1993).

Las MSSN, además de GABA, tienen otros neurotransmisores. Basándose en los neurotransmisores que contienen y el tipo de receptores de dopamina que expresan, se pueden dividir en dos poblaciones: una contiene dinorfina (Dyn) y sustancia P, y expresa receptores D₁, y otra cuenta con encefalina (Enk) y expresa principalmente receptores D₂. Las señales de ambas poblaciones de MSSN son inhibitorias y proyectan respectivamente a la parte externa del globo pálido (GPe; GABA/Enk/D₂), o a la parte interna del globo pálido (GPi; GABA/Dyn/sustancia P/D₁) y a la sustancia negra *pars reticulata* (SNpr; GABA/ Dyn/sustancia P/D₁) (Gerfen, 1988; 1992). Las proyecciones GABA/Enk al GPe pueden estar afectadas más intensamente que las proyecciones GABA/sustancia P al GPi (Reiner *et al.*, 1988).

Con respecto a la gliosis, en el estriado con EH se ha encontrado un incremento de astrocitos fibrilares. Estos astrocitos se detectan mediante inmunotinción con anticuerpos ant-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, o proteína ácida fibrilar de la glia); tienen un núcleo mayor y más vesicular de lo normal y poseen un número mayor de haces de filamentos gliales (Vonsattel *et al.*, 1985).

Con respecto a la atrofia cortical, se han observado alteraciones en las capas III, V y VI (y posiblemente también en la IV). Las neuronas más afectadas en la corteza son las neuronas de proyección piramidales grandes (Sotrel *et al.*, 1993). En este caso tampoco las interneuronas corticales aparecen afectadas. La gliosis en la corteza es menor que en el estriado, pero también aumenta con respecto a los controles.

En el cerebro con EH, las neuronas del estriado y corticales (neocortical y alo cortical) contienen inclusiones intraneuronales nucleares (IIN) características, que raramente están presentes dentro de otras estructuras subcorticales, como el GP y el tálamo, y generalmente están ausentes en otras partes del cerebro (DiFiglia *et al.*, 1997; Maat-Schieman *et al.*, 1999; Sieradzan *et al.*, 1999; Gutekunst *et al.*, 1999). Las IIN son inmunorreactivas a los anticuerpos contra el extremo N-terminal de la huntingtina (HTT) (pero no al segmento interno o C-terminal) y contra la ubiquitina. Hay agregados similares que también están presentes en el neuropilo, y que se han llamado “agregados del neuropilo” o

INTRODUCCIÓN

“neuritas distróficas” (ND). Mediante análisis de electrotransferencias e inmunodetección de fracciones nucleares del estriado y la corteza de pacientes con EH, se observó que los agregados nucleares y del neuropilo estaban formados por un fragmento de HTT N-terminal de 40 kDa. Las IIN son más frecuentes en la corteza que en el estriado en todos los grados patológicos de la EH, así como más comunes en los jóvenes que en los adultos.

1.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1.5.1. SÍNTOMAS EN LA EH DE INICIO ADULTO

La evolución clínica de la enfermedad de Huntington es gradual. Los pacientes pasan por una fase prodrómica comprendida entre la fase presintomática normal hasta el momento en el que se puede hacer la diagnosis con un examen neurológico y aparecen los síntomas característicos de la enfermedad.

1.5.1.1. SÍNTOMAS MOTORES EXTRAPIRAMIDALES

El síntoma más característico de esta enfermedad es el movimiento coreico de donde vino su antiguo nombre “Corea de Huntington”. La corea se define como un síndrome hipercinético caracterizado por movimientos involuntarios amplios, irregulares, generalizados y bruscos, que no pueden suprimirse voluntariamente por el individuo y que empeora con el estrés (Berardelli, 1999). Se ha observado que estos movimientos son menos frecuentes en pacientes que desarrollan la enfermedad en la juventud (Hayden, 1981), y sin embargo están casi siempre presentes cuando se desencadena en la edad adulta (Folstein, 1989).

La bradicinesia y la rigidez aparecen gradualmente hasta ser uno de los síntomas dominantes en la fase final de la enfermedad (Young *et al.*, 1986). Los sujetos que inician los síntomas en edad infantil y juvenil suelen desarrollar, más frecuentemente, rigidez y acinesia (Hayden, 1981).

Y por último, la distonía caracterizada por la lentitud en los movimientos y las posturas anormales, no aparecen con frecuencia en los primeros estadios pero se agrava y se hace prominente en los finales (Young *et al.*, 1986).

1.5.1.2. OTRAS DISFUNCIONES MOTORAS

Las alteraciones de la motilidad ocular se encuentran entre los síntomas que aparecen primero y afecta a la mayoría de los pacientes, sobre todo los movimientos sacádicos, especialmente en los que la enfermedad se desencadena a temprana edad (Beenen *et al.*, 1986; Oepen *et al.*, 1981).

Otra disfunción que aparece al comienzo de la enfermedad, es el empeoramiento de la función motora voluntaria (Thompson *et al.*, 1988; Hefter *et al.*, 1987; Van Vugt *et al.*, 2001). Se observa cierta torpeza o inhabilidad en las tareas diarias.

La hiperreflexia ocurre de forma temprana en el 90% de los pacientes, mientras que el clonus y la respuesta plantar extensora aparece más tarde y con menos frecuencia (Young *et al.*, 1986; Hayden, 1981). Además, este fenómeno tardío es predominante en pacientes jóvenes y adultos de edad avanzada (Young *et al.*, 1986).

La marcha se ve afectada de manera sutil en la primera fase, incluyendo dificultad al caminar, en la parada brusca y en el giro (Koller *et al.*, 1985). Conforme avanza la enfermedad la marcha se hace más dificultosa y como

consecuencia los pacientes sufren numerosas caídas y con frecuencia terminan confinados a una silla de ruedas.

El deterioro del habla se observa también al comienzo de la enfermedad (Podoll *et al.*, 1988; Coleman *et al.*, 1990).

La disfagia o dificultad para tragar afecta en primer lugar a la ingesta de líquidos y conforme avanza la enfermedad también afecta a los sólidos, lo que comúnmente causa la muerte por atragantamiento (Leopold *et al.*, 1985).

1.5.1.3. DETERIORO COGNITIVO

Entre los trastornos cognitivos destaca una demencia subcortical en fases tempranas de la enfermedad que incluyen lentitud en el proceso del pensamiento, cambios afectivos y de personalidad, así como problemas para integrar nuevos conocimientos (Caine *et al.*, 1985; Brandt *et al.*, 1986; Jason *et al.*, 1988; Pillon *et al.*, 1991).

El deterioro de la memoria es un proceso común de esta enfermedad que está presente con frecuencia en estos pacientes y en fases tempranas (Caine *et al.*, 1985). Se ve afectada la memoria visual (Pillon *et al.*, 1991), mientras que la

INTRODUCCIÓN

memoria verbal se mantiene hasta más tarde (Pillon *et al.*, 1991; Folstein 1989). Por ejemplo, los pacientes tienen dificultad para reproducir figuras geométricas pero pueden recordar hechos, palabras, o historias. A diferencia de otros síndromes neurológicos la orientación temporo-espacial se mantiene intacta hasta bien avanzada la enfermedad (Brandt *et al.*, 1988).

La falta de atención y concentración se ven disminuidas en las primeras etapas (Pillon *et al.*, 1991). Se producen problemas en la organización, secuenciación, y planificación; se reduce la habilidad para organizar asuntos o para poder ocuparse eficazmente de situaciones nuevas (Caine *et al.*, 1985; Brandt, 1986; Starkstein *et al.*, 1988).

Los trastornos del lenguaje y funciones relacionadas con él, como la fluidez verbal se ven reducidas severamente (Caine *et al.*, 1985). Sin embargo, la estructura semántica y sintáctica de las oraciones, encontrar la palabra adecuada, y la comprensión del discurso se mantienen intactos hasta la etapa final de la enfermedad (Folstein, 1989; Podoll *et al.*, 1988).

1.5.1.4. TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Se producen alteraciones emocionales, que van desde una ansiedad e irritabilidad bien definidas hasta prolongados periodos de depresión (Folstein *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 1991).

Los trastornos en el comportamiento consistentes en apatía, agresividad, desinhibición sexual, y abuso de alcohol son algunos síntomas que se han observado en los pacientes con enfermedad de Huntington (Morris *et al.*, 1991).

Además, los pacientes sufren procesos maníacos y alucinaciones (Morris *et al.*, 1991; Hayden, 1981; Rosenblatt *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 1997).

1.5.1.5. OTROS TRASTORNOS

La mayoría de los pacientes de EH también pierden peso durante el curso de la enfermedad, a pesar de tener una dieta adecuada o incluso una toma superior de carbohidratos (Pratley *et al.*, 2000). Además, en los estadios finales de la enfermedad también sufren problemas del sueño e incontinencia (Bruyn, 1968; Hansotia *et al.*, 1985; Hayden, 1981).

1.5.2. SÍNTOMAS EN LA EH DE INICIO JUVENIL

Aproximadamente el 10% de los pacientes con EH manifiestan los primeros síntomas de la enfermedad antes de los 20 años de edad. En contraste con las formas adultas, en las juveniles la rigidez y la bradicinesia aparecen desde el inicio. La corea está presente en casi todos los casos, pero a menudo es de corta duración y se sustituye por la rigidez (Hayden, 1981). Estos niños sufren frecuentes caídas, disartria, torpeza, hiperreflexia, y alteraciones de la motilidad ocular que se ponen de manifiesto al inicio de la enfermedad. El trastorno cerebelar es más prominente que en los pacientes adultos (Young *et al.*, 1986; Hayden, 1981; Nance, 1997).

Mientras que los ataques epilépticos en los pacientes adultos ocurren con la misma frecuencia que en la población normal (1%), en los pacientes jóvenes ocurre entre un 25 y 50% (Hayden, 1981; Jervis, 1963; Osborne *et al.*, 1982; Nance *et al.*, 2001). Estos ataques pueden ser generalizados o mioclónicos.

1.5.3. SÍNTOMAS EN LA EH DE INICIO SENIL

Las manifestaciones de la enfermedad, en los pacientes de inicio tardío, son menos severas. Aproximadamente el 25 % de todos los pacientes manifestarán los primeros síntomas después de los 50 años, y en estos pacientes la enfermedad seguirá su curso más lento de lo habitual (Myers *et al.*, 1985). La corea está presente, y la dificultad al caminar y la disfagia son comunes pero menos severos. El deterioro cognitivo, aunque invariablemente presente, puede ser menor que en los pacientes más jóvenes (Myers *et al.*, 1985). El inicio tardío está asociado con una progresión más lenta de la enfermedad, midiéndose por la invalidez funcional (Myers *et al.*, 1985).

1.6. GENÉTICA MOLECULAR

1.6.1. LOCALIZACIÓN DE LA MUTACIÓN RESPONSABLE DE LA EH

El defecto genético responsable de la EH se localizó en el cromosoma 4 en 1983 mediante análisis de ligamiento usando marcadores genéticos (Gusella *et al.*, 1983). Desde entonces, se siguió un trabajo riguroso para conocer su

INTRODUCCIÓN

localización exacta mediante clonación posicional (Gusella, 1989; 1991). Como consecuencia, surgió una nueva generación de marcadores genéticos en la región (Pohl *et al.*, 1988; Whaley *et al.*, 1991; MacDonald *et al.*, 1989a), se obtuvo el mapa genético (MacDonald *et al.*, 1989b; Allitto *et al.*, 1991) y físico (Bucan *et al.*, 1990; Bates *et al.*, 1991; Doucette-Stamm *et al.*, 1991; Altherr *et al.*, 1992), de las regiones implicadas, se clonó el telómero 4p de un cromosoma EH utilizando un cromosoma artificial de levadura (Bates *et al.*, 1990; Youngman *et al.*, 1992). Se llevó a cabo la creación de cóntigos de la región que podría contener el gen que posee el defecto genético causante de la EH utilizando cromosomas artificiales de levadura (Bates *et al.*, 1992) y cósmidos, así como, el análisis y caracterización de numerosos genes donde podría encontrarse el defecto responsable de la EH (Thompson *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1992; Ambrose *et al.*, 1992). Tras los resultados obtenidos por análisis de recombinación en familias con EH se identificó una región de 2.2 Mb, entre los marcadores D4S10 y D4S98 en 4p16.3, como el lugar más probable para encontrar el defecto genético causante de la EH (MacDonald *et al.*, 1989b; Bates *et al.*, 1991; Snell *et al.*, 1992). Los estudios de ligamiento mostraron diferencias en los cromosomas EH y los marcadores genéticos (Snell *et al.*, 1989; Theilman *et al.*, 1989) sugiriendo que la causa de la enfermedad era debido a múltiples mutaciones (MacDonald *et al.*, 1991). Sin embargo, el análisis de haplotipo con marcadores multialélicos indicaron que al menos un tercio de los cromosomas EH estaban relacionados ancestralmente (MacDonald *et al.*, 1992). El haplotipo compartido por estos cromosomas EH

indicó que un segmento de 500 kb entre los marcadores D4S180 y D4S182 era el sitio más probable del defecto genético.

Esta región de 500 kb fue el blanco de estudio en la búsqueda de secuencias codificantes que pudieran poseer el defecto genético responsable de la EH. El método elegido para su localización fue la amplificación exónica (Buckler *et al.*, 1991), el cual produce clones de exones, siendo este un método eficiente para la obtención de sondas que permiten el cribado de genotecas de cDNA. Esta estrategia identificó un nuevo gen, que se denominó IT15 (Important Transcript 15) que posteriormente fue denominado huntingtin o gen HD (HDCRG, 1993). La mutación consiste en una expansión de repeticiones CAG cerca del extremo 5' del gen localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3) (HDCRG, 1993; Rubinsztein *et al.*, 1994; Gusella *et al.*, 1996).

El gen está formado por 67 exones dentro de una secuencia génica de 180 kb, y codifica una proteína de ~348 kDa, llamada huntingtina (HTT) sin homología con otras proteínas conocidas (HDCRG, 1993; Ambrose *et al.*, 1994). La secuencia de repeticiones CAG se traduce a tramos de poliglutamina (poliQ) cerca del extremo N-terminal de la HTT.

La Sociedad Americana de Genética Humana establece que el número de repeticiones del alelo normal es menor o igual a 35 CAG y el alelo mutado con

INTRODUCCIÓN

repeticiones mayor o igual a 36. Aunque el fenotipo no siempre es penetrante, ~50% en un tamaño de CAG de 36-39 (Legius *et al.*, 1994; Rubinsztein *et al.*, 1996; McNeil *et al.*, 1997), aparece con total penetrancia (100%) cuando es mayor o igual a 40. Alelos con tamaño menor o igual a 26 CAG nunca se han asociado con un fenotipo EH y tampoco se ha demostrado mutabilidad (HDCR Group, 1993; Duyao *et al.*, 1993; Benjamín *et al.*, 1994; Kremer *et al.*, 1994). Sin embargo alelos de 27-35 CAG no se han asociado con un fenotipo EH (Kremer *et al.*, 1994; Rubinsztein *et al.*, 1996) pero se ha demostrado inestabilidad meiótica en esperma (Leeflang *et al.*, 1995; Telenius *et al.*, 1995; Chong *et al.*, 1997).

1.6.2. RELACIÓN ENTRE LA EXPANSIÓN CAG y EL FENOTIPO DE LA EH

Existe una correlación entre el número de repeticiones CAG y la edad a la que se desarrolla la enfermedad, siendo más precoz cuanto más larga es la secuencia repetida (Andrew *et al.*, 1993; Norremolle *et al.*, 1993; Snell *et al.*, 1993; Duyao *et al.*, 1993). La mayoría de los pacientes adultos tienen alrededor de 36-50 repeticiones, y la mayoría de los pacientes con EH juvenil tienen 60 o más repeticiones (Duyao *et al.*, 1993; Zühlke *et al.*, 1993; Ranen *et al.*, 1995). El número de repeticiones del trinucleótido supone entre el 65 y el 71% de la

varianza de la edad de inicio (Rosenblatt *et al.*, 2001). En los casos adultos la variabilidad es muy ancha y la longitud de la expansión no es muy útil para predecir la edad a la que se desarrollará la enfermedad. Sin embargo, no se ha aclarado la relación entre la longitud de las repeticiones y el ritmo de la progresión de la enfermedad. La progresión puede ser más rápida en los casos de mayor longitud de la zona repetitiva (Aylward *et al.*, 1997), pero no es un hallazgo universal (Kiebertz *et al.*, 1994). Los estudios realizados en cerebros post-mortem ponen de manifiesto cambios patológicos más avanzados en los casos de elevado número de repeticiones que en los casos con la misma duración de la enfermedad pero con un número menor de repeticiones, hecho que sostiene la correlación entre la longitud de las repeticiones y el ritmo de la progresión de la enfermedad (Furtado *et al.*, 1996).

En un estudio reciente se ha observado que el tamaño del alelo normal en los individuos con la EH influye en la relación entre el tamaño de la secuencia expandida y la edad de inicio de la enfermedad. Los resultados sugirieron que un aumento en el tamaño de alelo normal podría mitigar la expresión de la enfermedad (Djousse *et al.*, 2003).

1.6.3. ORIGEN DE LA MUTACIÓN

Las nuevas mutaciones de la EH se originan a partir de los llamados alelos intermedios (AI) que contienen entre 27 y 35 repeticiones (Goldberg *et al.*, 1993). La expansión se produce en la línea germinal paterna a un alelo de 36 o más repeticiones (Chong *et al.* 1997). Se ha encontrado que, entre el 1-3% de los pacientes, ninguno de sus padres tenía una secuencia repetitiva CAG \geq 36 repeticiones (Andrew *et al.*, 1997). Sin embargo, otro estudio estima en el ~10% los pacientes cuyos padres, sobre la base de su fenotipo, no se consideraron portadores de la EH (Falush *et al.*, 2000).

1.6.4. ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EH JUVENIL.

Alrededor del 10% de los individuos afectados con la EH manifiestan la enfermedad antes de los 20 años. En estas formas juveniles de la EH, el 80%, aproximadamente, de los pacientes han heredado el gen mutado del padre (Harper, 1991; Srivastava, 1999). A este respecto se han hecho estudios (en concreto, con una familia del lago Maracaibo) que demuestran que se producen fenómenos de anticipación génica (la edad de inicio de la enfermedad tiende a disminuir en sucesivas generaciones) por expansión de tripletes cuando la

transmisión de la mutación es por vía paterna (HDCRG, 1993; Ranen *et al.*, 1995; Andrew *et al.*, 1993) independientemente del sexo del hijo. Se han propuesto varios factores que expliquen este hallazgo. Los factores protectores maternos mediados a través de la mitocondria u otras influencias citoplasmáticas son compatibles con los resultados de algunos estudios que demuestran que no hay cambio importante en la edad de comienzo de la enfermedad del hijo cuando la transmisión es materna, pero hay una disminución en la edad a la que se desarrolla la enfermedad cuando la transmisión es paterna (Boehnke M *et al.*, 1983; Bird *et al.*, 1974; Ridley *et al.*, 1988). La impronta (Reik, 1988; Ridley *et al.*, 1991) y, más recientemente, la amplificación selectiva de las secuencias repetitivas dentro del genoma podrían explicar los mecanismos implicados en el efecto de la transmisión paterna (Vogel *et al.*, 1986). Ya que no existe inestabilidad somática y los gemelos monocigóticos presentan el mismo tamaño de repeticiones CAG explica que la expansión ocurra durante la gametogénesis (Leeflang *et al.*, 1995). Aunque la inestabilidad meiótica puede ocurrir tanto en la transmisión materna como en la paterna, es en la transmisión paterna donde se produce una duplicación o más del tamaño de la secuencia trinucleotídica CAG (Telenius *et al.*, 1993).

En la transmisión materna se observa igual número de expansiones que de contracciones, y los cambios son normalmente pequeños, con un rango de 1 a

INTRODUCCIÓN

5 repeticiones. Se han observado casos raros donde la madre ha transmitido largas expansiones (Nance *et al.*, 1999a; Laccone & Christian, 2000).

En contra de la clásica definición de impronta, la expansión CAG está influenciada por el sexo del embrión. Este hecho se ha observado en ratones transgénicos, que al igual que los humanos transmitían la expansión por la línea germinal masculina. Sin embargo, el tamaño de las repeticiones CAG en el gen HD mutado era diferente en machos y hembras proviniendo del mismo padre. Los machos expandían las repeticiones mientras que las hembras las contraían (Kovtun *et al.*, 2000).

De forma similar a los adultos, existe una correlación entre el número de repeticiones CAG en el gen HD y la edad de inicio en personas con la enfermedad de Huntington juvenil (Telenius *et al.*, 1993). Los niños que sufren la enfermedad a edad muy temprana poseen un elevado número de repeticiones CAG. Está documentado el caso de un niño con 2 años con una expansión de 250 repeticiones (Nance *et al.*, 1999a). La expansión más larga encontrada hasta ahora es de 265 repeticiones CAG en una niña de 3,5 años (Milunsky *et al.*, 2003). En realidad, los pacientes juveniles se encuentran al final de la curva que describe la relación entre edad de inicio y tamaño de la secuencia trinucleotídica CAG.

1.6.5. HOMOCIGOSIS EN LA EH

La homocigosis en la EH es rara, y solo se ha documentado en pocas ocasiones.

Avila-Giron (1973) realizó un estudio en el estado de Zulia, Venezuela, donde observó que el 30% de la población afectada de la EH tenían al padre y a la madre afectados con la EH. En una familia, 4 de los 14 hermanos estudiados mediante análisis de segregación de DNA fueron homocigotos para el haplotipo con el que se segregó el gen HD (Wexler *et al.*, 1987). Cabe destacar, la falta de características clínicas que pudieran distinguir a estas personas de los enfermos heterocigotos. Myers (1989) propuso que la homocigosis para la EH no aumentaba la severidad de la clínica comparada con la forma heterocigota de dicha enfermedad.

Esto sugiere, que a diferencia de otras enfermedades con un patrón de herencia autosómico dominante como la hipercolesterolemia familiar o la telangiectasia hemorrágica hereditaria donde los homocigotos presentan una manifestación más severa de la enfermedad, el defecto bioquímico en la EH no es debido a la deficiencia de producto génico sino a la ganancia de función de la proteína.

INTRODUCCIÓN

Un estudio reciente (Squitieri *et al.*, 2003) comparó las características clínicas (edad de inicio, síntomas, severidad y evolución de la enfermedad) en sujetos homocigotos para la EH con heterocigotos para la misma enfermedad, y observó un declive motor, cognitivo y conductual más rápido en los homocigotos, (la neurodegeneración fue comprobada mediante imagen) que en los heterocigotos y la edad de inicio de la enfermedad no varió. Esto sugiere un mecanismo bioquímico diferente para la EH.

1.6.6. PROTEÍNA HUNTINGTINA

El gen HD se expresa como dos formas de mRNA que difieren en la proporción relativa en diferentes tejidos. El transcrito más largo de aproximadamente 13,7 kb se expresa principalmente en el cerebro adulto y fetal. Mientras que el transcrito de aproximadamente 10,3 kb se expresa en mayor número de tejidos (Ambrose *et al.*, 1994). Los dos mRNA sólo difieren en la longitud del extremo 3' no traducido, de tal manera que codifican para la misma proteína huntingtina de aproximadamente 3140 aminoácidos (dependiendo del grado de polimorfismo en las repeticiones). La secuencia que codifica para la expansión de glutaminas comienza en el codón 17, en el primer exón. La secuencia de la HTT se ha conservado en un grado considerable a través de la evolución, así por ejemplo, es muy parecida a la encontrada en roedores y peces.

La principal diferencia se encuentra en las repeticiones de poliglutaminas, que en roedores es de 7, y en humanos es normalmente de 11 a 35, por ser como ya se comentó altamente polimórfica. Otra diferencia importante, se encuentra en otra región polimórfica rica en prolinas, también localizada en el extremo amino terminal de la proteína.

La HTT es una proteína de expresión ubicua (Li *et al.*, 1993; DiFiglia *et al.*, 1995; Sharp *et al.*, 1995; Bhide *et al.*, 1996; Gourfinkel-An *et al.*, 1997). Dentro del sistema nervioso central (SNC) no hay un enriquecimiento de HTT en el estriado, comparado con otras regiones cerebrales. El gen HD y su proteína mutante se transcriben y traducen en el cerebro, además, en niveles comparables con los de la HTT normal desde los estadios tempranos del desarrollo embrionario (Landwehrmeyer *et al.*, 1995; Bhide *et al.*, 1996; Sapp *et al.*, 1997).

Dentro de las neuronas, la proteína se localiza fundamentalmente en el citoplasma, asociada con membranas o citoesqueleto en el soma, dendritas, axones y terminales nerviosos (DiFiglia *et al.*, 1995; Gutekunst *et al.*, 1995; Sharp *et al.*, 1995; Sapp *et al.*, 1997; Tukamoto *et al.*, 1997). La HTT se localiza también en membranas plasmáticas e intracelulares que contienen clatrina (Velier *et al.*, 1998), una proteína relacionada con la endocitosis, y su asociación con endosomas aumenta por la activación de la adenilato ciclasa y de la estimulación de los receptores de dopamina D₁ (Kim *et al.*, 1999).

INTRODUCCIÓN

Mediante tinciones dobles que permiten distinguir subtipos de neuronas del estriado, se ha observado que hay poca (o ninguna) correlación entre el nivel de expresión de HTT constitutivo y la vulnerabilidad en la EH. De hecho, las MSSN tienen una inmunorreactividad variable, normalmente de moderada a baja para HTT; y algunas parecen no ser inmunorreactivas en absoluto (Gourfinkel-An *et al.*, 1997; Ferrante *et al.*, 1997). También se ha observado que las interneuronas del estriado (las cuales no están afectadas por la patología) tienen niveles variables de inmunorreactividad en el cerebro humano y en el de rata (Sapp *et al.*, 1997; Fusco *et al.*, 1999). En contraste con esto, las neuronas piramidales corticales (que sí se ven afectadas por la patología), y fundamentalmente las de las capas que dan lugar a las proyecciones cortico-estriatales, contienen de un modo uniforme niveles altos de HTT (Fusco *et al.*, 1999).

Se desconoce la función de la HTT, pero parece ser vital para el desarrollo ontogénico, ya que ratones homocigotos para mutaciones nulas de HTT mueren en fase de embriogénesis temprana (Duyao *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 1995; Zeitlin *et al.*, 1995). Para ahondar en la posible función de la HTT se han identificado proteínas que interaccionan con ella, la mayoría de las cuales interaccionan tanto con la proteína normal como con la mutante (Bao *et al.*, 1996; Burke *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Boutell *et al.*, 1998; Boutell *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Steffan *et al.*, 2000). Entre ellas, HAP1 (Li *et al.*,

1995; Block-Galarza *et al.*, 1997), HIP1 (Wanker *et al.*, 1997; Kalchman *et al.*, 1997) y HIP14 (Singaraja *et al.*, 2002) están asociadas con vesículas de membrana e interaccionan con proteínas del citoesqueleto, lo cual sugiere un papel para la HTT en la endocitosis, el tráfico intracelular y el reciclaje de membranas (Gusella *et al.*, 1998). En muchos casos, la interacción de la HTT con estas proteínas es dependiente de poliQ, como es el caso de HAP1 (Li *et al.*, 1995), HIP1 (Wanker *et al.*, 1997), cistationín- β -sintasa (Boutell *et al.*, 1998), caspasa 3 (Goldberg *et al.*, 1996) y GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Burke *et al.*, 1996). Esto, junto con su expresión ubicua, ha sugerido que la expresión regional de las proteínas que interaccionan con la HTT podría determinar el patrón selectivo de la neurodegeneración. Sin embargo, estas proteínas se expresan en todo el cerebro y no están especialmente enriquecidas en las regiones más afectadas en la EH.

1.6.7. HUTINGTINA EXPANDIDA O MUTADA

La mayor parte de las evidencias a favor de la ganancia de función en la EH se derivan de los estudios genéticos que demuestran que pacientes heterocigotos para la mutación de la EH presentan el espectro completo de fenotipo patológico, y que éste no es clínicamente más agudo en personas homocigotas (Wexler *et al.*, 1987; Durr *et al.*, 1999). Otros estudios iniciales

INTRODUCCIÓN

argumentaban a favor de un mecanismo patogénico común centrado alrededor de los tramos de poliQ, ya que en las enfermedades de tripletes CAG, éstos se encuentran en genes que codifican proteínas sin ninguna homología entre sí, aparte de los tramos de poliQ. En cada caso, la proteína normal tiene aproximadamente menos de 35 residuos de glutamina; sin embargo, las formas patogénicas contienen 39 ó más residuos (Zoghbi *et al.*, 2000). De acuerdo con esto, se ha observado que la inserción de un tramo de poliQ dentro de un gen neuronal no relacionado con ninguna de estas patologías, el de la HPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa), da lugar a ratones con un fenotipo neurológico muy similar al que se observa en ratones que expresan las formas truncadas de la HTT mutada (Ordway *et al.*, 1997).

Otra prueba a favor de la hipótesis de ganancia de función tóxica en la EH es el hecho de que los embriones *knockout* homocigotos para HTT mueran cerca del día embrionario 7,5 (Duyao *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 1995; Zeitlin *et al.*, 1995), mientras que pacientes con la EH homocigotos alcanzan la edad adulta. Los ratones *knockout* heterocigotos, con sólo la mitad del alelo normal de la HTT, superan el estadio embrionario, alcanzan la edad adulta y presentan un fenotipo normal (Duyao *et al.*, 1995; Zeitlin *et al.*, 1995). Además, también se ha observado que en cultivo de células pluripotentes nulas para HTT se da la diferenciación a neuronas y sinaptogénesis (Metzler *et al.*, 1999). Finalmente, individuos cuya

expresión de HTT está reducida al 50% como resultado de una deleción en el gen HD (Ambrose *et al.*, 1994) no desarrollan el fenotipo patológico de la EH.

En otro trabajo se combinan ratones *knockout* y ratones *knockin*, a los que se les ha modificado el alelo con 50 repeticiones CAG (White *et al.*, 1997). Este estudio demostraba que una única copia del gen de la HTT es suficiente para el correcto desarrollo cerebral, independientemente de la longitud de las CAG, de modo que la HTT mutada puede sustituir a la HTT normal en este estadio. Esto concuerda con el hecho de que pacientes homocigotos para la EH tienen un desarrollo embrionario normal.

Los estudios con ratones transgénicos, así como de líneas celulares transfectadas, han proporcionado más evidencias de que los tramos de poliQ pueden ser tóxicos por sí mismos. Los ratones transgénicos que expresan un pequeño fragmento de la HTT con un tramo de poliQ expandido desarrollan signos neurológicos anormales y neuropatológicos (Mangiarini *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2000). Según esto, los efectos tóxicos de la mutación en la EH (y en otras enfermedades por expansión de tripletes CAG) no parecen ser el resultado de una pérdida de función de la proteína mutante. Más bien parecen indicar que las poliQ expandidas confieren propiedades nuevas a la proteína mutada, lo que conllevaría a nuevas o modificadas interacciones con otras

INTRODUCCIÓN

proteínas intracelulares. Además, el efecto tóxico de estos tramos de poliQ expandidos podría estar regulado por el entorno proteico en el que se encuentren.

Las razones anteriormente expuestas parecen indicar que la EH se debe a una ganancia de función tóxica inducida por la poliQ expandida. Sin embargo, hay evidencias de que algunos de los rasgos de la sintomatología de la EH se producen probablemente por una cierta pérdida de función normal de la HTT (Cattaneo *et al.*, 2001). La inactivación condicional selectiva de la HTT normal en el cerebro (y los testículos) de ratón ha permitido examinar el efecto de la pérdida de la función normal de la proteína en los adultos (Dragatsis *et al.*, 2000). Estos animales presentaban un *claspig* (distonía sostenida en las extremidades al suspender al animal de la cola) agudo progresivo, un hecho que se ha observado también en ratones transgénicos para la EH (Mangiarini *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1998; Hodgson *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2000). También tenían déficit motores, de modo que a los 10-12 meses, los animales eran hipoactivos y sufrían temblores, y los ratones mutantes sobrevivían como máximo 13 meses. Los análisis histológicos demostraron que había degeneración del tejido en el estriado y la corteza, acompañada de una apoptosis y una degeneración de los axones (Dragatsis *et al.*, 2000).

Un estudio en *Drosophila* ha sugerido que la HTT expandida causa neurodegeneración a través de dos mecanismos: uno que incluye pérdida de

transporte axonal y otro, que produce acumulación de la HTT expandida en el núcleo y apoptosis (Gunawardena *et al.*, 2003). *In vitro*, se ha observado que la HTT expandida inhibe el transporte axonal y los procesos de elongación neurítica. Estos efectos son mayores con proteínas truncadas y ocurre sin agregados detectables (Szebenyi *et al.*, 2003).

De acuerdo con estos hallazgos, se ha observado que el aumento de la expresión de la HTT normal en ratones transgénicos protege contra los efectos tóxicos de la HTT mutada (Leavitt *et al.*, 2001). Parece que los efectos antiapoptóticos de la HTT ocurren vía secuestro de HIP1, una molécula proapoptótica que se expresa específicamente en el cerebro (Hackam *et al.*, 2000) y que interacciona eficientemente con HTT normal, pero no con HTT mutada (Kalchman *et al.*, 1997; Faber *et al.*, 1998).

Existen evidencias a favor de que la HTT desempeña un papel importante en la supervivencia de las células del Sistema Nervioso Central (SNC) (Rigamonti *et al.*, 2000; Zuccato *et al.*, 2001). En estos estudios se ha visto que la sobreexpresión de HTT normal en las líneas celulares tiene un efecto antiapoptótico “corriente abajo” de los miembros proapoptóticos Bcl-2 y “corriente arriba” de la activación de la caspasa 3 (Rigamonti *et al.*, 2000). Se ha comprobado que la HTT normal aumenta la transcripción del gen del BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), factor que favorece la supervivencia de las

INTRODUCCIÓN

neuronas del estriado, lo que influye sobre la producción y la liberación del BDNF que deriva de la corteza a las dianas del estriado, y también se ha comprobado que en la EH, la disfunción cortical ocurre en parte por la pérdida de la producción de BDNF mediado por la HTT (Zuccato *et al.*, 2001). Además se ha demostrado que la HTT normal inhibe a NRSE (*Neuron-Restrictive Silencer Element*), aumentando la transcripción de BDNF (Zuccato *et al.*, 2003).

1.6.7.1. PATOGENICIDAD DE LA HTT EXPANDIDA

1.6.7.1.1. ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La HTT es fundamentalmente una proteína citosólica; sin embargo, la región N-terminal de la HTT mutante, y quizá también la proteína mutante completa (Wheeler *et al.*, 2000), están presentes en el núcleo en algunas circunstancias. Una característica de la secuencia de la HTT es la presencia de un tramo largo de poliglutaminas seguido de un dominio de poliprolinas. Muchos factores de transcripción contienen unos dominios ricos en glutaminas y prolina, que pueden regular su actividad (Courey *et al.*, 1989; Gerber *et al.*, 1994); de hecho, el receptor de andrógenos, que tiene expansiones de tramos de poliQ anormales en la atrofia muscular bulbospinal, funciona como un factor de transcripción nuclear. Aunque la HTT no parece tener un dominio de unión al

DNA, su estructura N-terminal sugiere que interacciona con proteínas de regulación transcripcional (Huang *et al.*, 1998; Cha, 2000; Kegel *et al.*, 2002; Sipione *et al.*, 2002). Además, el único dominio estructural conocido de la HTT son múltiples dominios HEAT (Andrade *et al.*, 1995), que se han encontrado también en las proteínas lanzaderas nucleares, como las importinas (Vetter *et al.*, 1999).

Saudou *et al.* (1998) demostraron que la localización intranuclear de la HTT mutante (formas truncadas N-terminal) es necesaria para inducir degeneración en neuronas del estriado en cultivo. De hecho, hay cada vez más evidencias de que la HTT mutante es capaz de interrumpir las funciones normales dentro del núcleo. Concretamente, la HTT se puede unir al factor de transcripción TBP (*TATA Binding Protein*), que se secuestra dentro de los agregados de HTT mutante tanto en los cerebros de los pacientes de EH como *in vitro* (Huang *et al.*, 1998). Recientemente se ha demostrado que la HTT con tramos de poliQ expandidos interacciona más eficientemente con CBP [*CREB (cAMP-Response Element Binding Protein) Binding Protein*], y lo secuestra dentro de las inclusiones nucleares, lo que lleva a un descenso de CBP funcional en las células en cultivo y a cambios en la expresión génica y en la toxicidad celular (Steffan *et al.*, 2000; Nucifora *et al.*, 2001), así como a una reducción en la acetilación de histonas (Steffan *et al.*, 2001; McCampbell *et al.*, 2001). Sin embargo, otro estudio en modelos de ratón EH sugiere que la alteración de la expresión génica se produce

INTRODUCCIÓN

por la interacción de HTT mutada soluble con los factores de transcripción en vez de estar secuestrados en inclusiones nucleares (Yu *et al.*, 2002; Dunah *et al.*, 2002).

La HTT se puede unir también a p53 (proteína proapoptótica) mediante secuencias SH3PXXP (*Sarc-homology*) distales a sus tramos de poliQ (Steffan *et al.*, 2000), y reprime la transcripción de los promotores que regula. La HTT mutante también interacciona *in vitro* a través de su dominio N-terminal y de modo dependiente de poliQ con proteínas represoras de la transcripción como N-COR (Boutell *et al.*, 1999), lo que podría dar lugar a la expresión de genes normalmente reprimidos. Además, la HTT se puede unir a otros factores de transcripción (HYP-B) y componentes del espliceosoma (HYP-Ay-C) (Faber *et al.*, 1998; Passani *et al.*, 2000) a través de sus poliprolinas de un modo dependiente de poliQ.

Se ha observado que la expresión del exón 1 de la HTT mutante está asociada con la expresión alterada, fundamentalmente reducida, de diversos transcritos, tanto en líneas celulares (Li *et al.*, 1999) como en ratones transgénicos (Cha *et al.*, 1998; 1999). Mediante el uso de microchips de DNA se ha estudiado la magnitud de las anomalías transcripcionales en el estriado de los ratones R6/2 (transgénicos de EH), y se ha visto que son alteraciones selectivas, limitadas sólo al 1,2% de los cerca de 6.000 genes estudiados (Luthi-Carter *et al.*, 2000; 2002).

1.6.7.1.2. ALTERACIONES EN EL TRÁFICO CELULAR DE VESÍCULAS Y ENDOCITOSIS

Diversas evidencias apuntan a que la HTT normal debe estar implicada en el tráfico celular de vesículas y endocitosis. Como ya se ha comentado, la HTT interacciona con diversas proteínas que se asocian con vesículas de membrana y que interaccionan con proteínas del citoesqueleto (Li *et al.*, 1995; Wanker *et al.*, 1997; Kalchman *et al.*, 1997; Sittler *et al.*, 1998; Modregger *et al.*, 2002). Basándose en estos y otros estudios (Block-Galarza *et al.*, 1997) se ha sugerido que podría participar en el transporte retrógrado. Además, la HTT se localiza en membranas que contienen clatrina (Velier *et al.*, 1998), y tras una estimulación de la adenilato ciclasa o de receptores de dopamina tipo D₁, se redistribuye del cuerpo celular a las dendritas y los botones sinápticos (Kim *et al.*, 1999).

Se ha comprobado que las vesículas sinápticas incubadas *in vitro* con fragmentos N-terminal de HTT mutante tienen alterada la recaptación de glutamato (Li *et al.*, 2000). Otros estudios llevados a cabo en cerebros humanos con EH y en modelos de ratones transgénicos (DiFiglia *et al.*, 1997; Hodgson *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000), así como en el ratón *knockout* condicional (Dragatsis *et al.*, 2000), demuestran que hay una degeneración de axones, lo cual es compatible con la hipótesis de que la HTT desempeñe un papel en el tráfico celular y de vesículas sinápticas. Además, también se ha demostrado que la HTT

INTRODUCCIÓN

mutante puede afectar al sistema endosomal/lisosomal (Kegel *et al.*, 2000), de modo que un proceso que normalmente está regulado de forma precisa (Kim *et al.*, 1999), se puede volver destructivo, vía activación del sistema endosomal/lisosomal, y producir la autofagia (Kegel *et al.*, 2000).

1.6.7.1.3. ALTERACIONES MITOCONDRIALES

En el cerebro con EH, las actividades enzimáticas de diversas proteínas mitocondriales que participan en la fosforilación oxidativa están disminuidas (Gu *et al.*, 1996; Browne *et al.*, 1997; Tabrizi *et al.*, 1999). En concreto, las actividades de los complejos II-III y IV se reducen en el estriado con EH. También se ha observado una reducción de la actividad de la aconitasa en el estriado y en la corteza (Tabrizi *et al.*, 1999), así como defectos en el complejo I en el músculo atrofiado (Koroshetz *et al.*, 1997; Arenas *et al.*, 1998), además de que algunas de estas diferencias se reproducen también en el modelo transgénico R6/2 (Tabrizi *et al.*, 2000).

1.6.7.1.4. ACTIVACIÓN DE CASPASAS Y APOPTOSIS

Como ya se ha comentado, en el estriado y en la corteza cerebrales de pacientes con EH hay IIN y ND que se forman por un fragmento N-terminal de la HTT con tramos de poliQ expandidos (DiFiglia *et al.*, 1997).

Ciertos estudios demuestran que los tramos de poliQ expandidos dentro de proteínas truncadas son más tóxicos para las células transfectadas que los tramos expandidos embebidos en las proteínas mutadas (Hackam *et al.*, 1998), por lo que se sugiere que el corte proteolítico es un paso necesario en la iniciación de las enfermedades de poliQ. De acuerdo con esto, hay dos estudios que (Hodgson *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000) demuestran que existe una acumulación selectiva de fragmentos N-terminales de HTT en las neuronas del estriado y sus proyecciones axonales en ratones *knockin* y transgénico para EH. Estos resultados han dado lugar a la hipótesis de que la vulnerabilidad del estriado en la EH puede relacionarse con el procesamiento específico de la proteína mutada (Li *et al.*, 2000). Esto sugiere que la generación de fragmentos N-terminales de la HTT puede ser un evento significativo *per se* para la patología de la EH.

Dentro del N-terminal de la HTT hay agrupados sitios consenso de corte por caspasas. Las caspasas son enzimas proteolíticas que se activan en células

INTRODUCCIÓN

que sufren apoptosis, y han estado implicadas en la muerte celular dependiente de poliQ en modelos de células en cultivo, donde la expresión de HTT mutante aumentaba la susceptibilidad a estímulos apoptóticos (Kim *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 1999; Wellington *et al.*, 2000). En este sentido, ciertos ensayos *in vitro* muestran que la caspasa 3 y la 6, y posiblemente también la 9 y la 10 (pero no la 7 y la 8), pueden cortar eficientemente la HTT con alguna dependencia de las repeticiones. El corte se da a continuación del dominio poliQ, y generan fragmentos N-terminales de proteína truncada del tamaño supuestamente neurotóxicos en cultivos celulares transfectados (Goldberg *et al.*, 1996; Wellington *et al.*, 1998; 2000).

También se ha estudiado el papel de la caspasa 1 en la EH mediante experimentos de dobles transgénicos al cruzar el ratón R6/2 y un mutante dominante negativo de la caspasa 1 (Ona *et al.*, 1999). La inhibición de la caspasa 1 en estos animales dio lugar a una supervivencia prolongada y a un retraso de todas las manifestaciones del fenotipo EH, entre ellas la aparición de IIN y la reducción de la expresión de genes receptores de neurotransmisores y síntomas neurológicos. También se ha encontrado una forma activada de caspasa 8 en la fracción insoluble del estriado (pero no del cerebelo) de pacientes con la EH, lo que sugiere que la caspasa 8 puede estar secuestrada y activada dentro de los agregados de HTT mutante (Sánchez *et al.*, 1999). La caspasa 8 no corta normalmente la HTT, pero cuando se activa, puede dirigirse contra otras

proteínas diana dentro de la célula que podrían contribuir a la patogénesis. La caspasa 8 puede activarse por la interacción de HIP1 y HIPPI (*HIP1 Protein Interaction*) (Gervais *et al.*, 2002).

Sin embargo, no está claro que en la EH la muerte celular se dé por apoptosis. De hecho, un estudio en un modelo transgénico y en cerebros con EH sugiere que la pérdida neuronal ocurre por un mecanismo distinto de los clásicos apoptosis o necrosis (Turmaine *et al.*, 2000).

1.6.7.1.5. ALTERACIONES SINÁPTICAS Y ELECTROFISIOLÓGICAS

Se ha comprobado que, en el estriado de cerebros con EH, las MSSN presentan alteraciones dendríticas consistentes en cambios en la densidad de las espinas y en anomalías en el tamaño y forma de las espinas (Graveland *et al.*, 1985), que podrían indicar cambios en las propiedades de las MSSN.

A este respecto, diversos estudios con modelos de ratones transgénicos sugieren que los déficit motores en la EH son una consecuencia de cambios morfológicos y fisiológicos acumulativos en las neuronas, que alteran el circuito corticoestriatal. Se ha observado que la expresión de la HTT mutante produce una hipersensibilidad de los receptores de tipo NMDA y kainato (Levine *et al.*, 1999;

INTRODUCCIÓN

Sun *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002), y que los fragmentos N-terminales de HTT con poliQ se asocian con vesículas sinápticas que inhiben la recaptación de glutamato (Li *et al.*, 2000).

En un estudio con un modelo de ratón con EH presintomático (Bibb *et al.*, 2000) se han descrito también deficiencias agudas en la señalización por dopamina. Por otro lado, se ha publicado recientemente que en los ratones R6/2 hay genes con expresión reducida que pertenecen a sistemas de señalización neuronal específicos, entre ellos receptores de dopamina tipo D₁ y D₂, de adenosina A₂, metabotrópicos de glutamato tipo I (mGluR1) y tipo II (mGluE2 y mGluR3), y de glutamato ionotrópicos tipo kainato y AMPA (Cha *et al.*, 1998, 1999), enzimas de transducción de señal intracelulares, y diversos receptores y proteínas que modulan la señalización dependientes de Ca²⁺ (Luthi-Carter *et al.*, 2000). Estos ratones, además, tienen numerosas alteraciones electrofisiológicas y morfológicas (menores campos dendríticos y una disminución de las densidades de las espinas) que indican que las propiedades sinápticas de las MSSN están alteradas (Klapstein *et al.*, 2001).

También se han percibido cambios en los potenciales de la membrana y en la plasticidad sináptica en modelos murinos con EH, que podrían explicar los déficit cognitivos que presentan los enfermos de la EH antes del inicio de los síntomas clásicos (Levine *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000; Usdin *et al.*, 1999).

1.6.7.2. AGREGADOS DE HUNTINGTINA

1.6.7.2.1. MECANISMO DE AGREGACIÓN

Un hecho común de todas las proteínas mutantes con poliQ es su tendencia a formar agregados intracelulares (a menudo tras un corte proteolítico parcial) en el cerebro de pacientes con EH y demás enfermedades por expansión de tripletes CAG (DiFiglia *et al.*, 1997; Ross, 1997; Becher *et al.*, 1998; Sieradzan *et al.*, 1999; Gutekunst *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2001). Tales agregados pueden formarse *in vitro* (Scherzinger *et al.*, 1997), en levaduras transfectadas y cultivos celulares (Saudou *et al.*, 1998; Hackam *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Martindale *et al.*, 1998; Lunkes *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 1999; Krobitch *et al.*, 2000), y en ratones transgénicos o *knockin* que expresan la HTT mutante con varias longitudes y tamaños de repeticiones CAG (Mangiarini *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 1998; Schilling *et al.*, 1999; Shelbourne *et al.*, 1999; Hodgson *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000; Lunkes *et al.*, 2002).

Se han propuesto tres mecanismos bioquímicos para la agregación. El primero propone que los agregados de HTT mutante se forman gracias a la acción de la transglutaminasa. La HTT y otras proteínas con poliQ pueden, *in vitro*, sufrir transglutaminación, con lo que se forman así uniones covalentes vía

INTRODUCCIÓN

enlaces isopeptídicos glutamina-lisina, pero no se sabe si esos agregados covalentes se forman también *in vivo* (Kahlem *et al.*, 1998). De acuerdo con esto, la HTT podría ser sustrato de la transglutaminasa (Kahlem *et al.*, 1998), cuya actividad parece que está aumentada en cerebros con EH (Karpuj *et al.*, 1999; Lesort *et al.*, 1999). El segundo mecanismo propuesto es la agregación de la HTT dependiente de dominios SH3, mediada por sus motivos ricos en prolinas (Sittler *et al.*, 1998). Finalmente, las poli-L-glutaminas pueden actuar como “cremalleras polares” (*polarzippers*), que se unen mediante puentes de hidrógeno entre sus grupos amida formando estructuras de horquillas estables, que a su vez crean hojas de β -lámina (Perutz *et al.*, 1994; Perutz, 1996). De hecho, *in vitro*, fragmentos N-terminales de la HTT mutante se agregan espontáneamente en fibras de tipo amiloide (Scherzinger *et al.*, 1997), agregación que depende del tiempo, de la concentración y de la longitud de las poliQ. Los fragmentos de HTT con longitudes de poliQ dentro del intervalo patológico (más de 40 kDa) son insolubles, mientras que los fragmentos con longitudes menores son solubles. Estos estudios sugieren que, por encima de un cierto umbral de longitud, los tramos de poliQ desarrollan cambios conformacionales que favorecen su agregación. Además, los estudios realizados en un modelo transgénico condicional TetOff de la EH (Yamamoto *et al.*, 2000; Martín-Aparicio *et al.*, 2001) demuestran que, cuando se suprime la expresión de la HTT mutante, las neuronas son capaces de disiparla eficientemente, ya sea de forma agregada o no.

1.6.7.2.2. RELEVANCIA PATOGENICA DE LOS AGREGADOS

Las inclusiones son una característica común no sólo de los trastornos por expansión de tripletes CAG, sino también de otras enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, lo que sugiere que la agregación de proteínas podría causar neurodegeneración a través de un mecanismo general (Price *et al.*, 1998; Tobin *et al.*, 2000). Sin embargo, la relevancia de la formación de agregados para la etiología de la EH no está clara. Así en algunos estudios se ha implicado a los agregados como los desencadenantes de la neurodegeneración, ya que tanto éstos como la patogenicidad comparten el mismo umbral de longitud de las poliQ (Scherzinger *et al.*, 1997). En el modelo del ratón transgénico R6/2 (Davies *et al.*, 1997) la aparición de los agregados precede al inicio de la sintomatología. Así mismo, estudios realizados en células transfectadas apoyan la hipótesis de que la toxicidad está inducida por estos agregados (Waelter *et al.*, 2001). Por el contrario, otros estudios disocian los agregados de la toxicidad celular. En los estudios llevados a cabo tanto con ratones transgénicos TetOff como con su modelo equivalente en cultivo (Martín-Aparicio *et al.*, 2001) demuestran que no hay muerte neuronal a pesar de la presencia de agregados. También en los ratones transgénicos utilizando YACs (cromosomas artificiales de levadura) se ha observado que niveles altos de expresión de la HTT mutante producen neuropatología e inclusiones; sin embargo, niveles bajos de expresión producen una neuropatología similar a la EH

INTRODUCCIÓN

sin inclusiones visibles (Leavitt *et al.*, 1999). En este sentido, es interesante resaltar que ratones EH *knockin* (Shelbourne *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2000) no presenten anormalidades neuropatológicas significativas (como reducción del peso del cerebro, pérdida neuronal o astrocitosis reactiva), a pesar de la presencia de agregados de HTT mutante.

Otros estudios llevados a cabo en células transfectadas no sólo disocian la formación de inclusiones y la supervivencia celular (Kim *et al.*, 1999) sino que también sugieren que las inclusiones intranucleares pueden reflejar un mecanismo de protección contra la toxicidad que induce la HTT soluble (Saudou *et al.*, 1998). En este estudio, un mutante dominante negativo de la ruta de la ubiquitina suprimía las inclusiones, pero aceleraba la muerte celular. Asimismo, en un modelo transgénico de SCA1 se ha observado que la expresión de la ataxina 1, con 77 glutaminas y una delección de regiones que favorecen la autoagregación, da lugar a una ataxia y una patología en ausencia de agregados detectables de ataxina 1 (Klement *et al.*, 1998). Más aún, cruzando un transgénico de ataxina 1 con poliQ, expandidas con un ratón que carecía del gen de una ligasa de ubiquitina, se suprimía la formación de agregados de ataxina 1, pero la patología aumentaba considerablemente (Cummings *et al.*, 1999). Estos estudios sugieren que los agregados reflejan un mecanismo celular que protege a las neuronas de los efectos tóxicos de la proteína mutante, y argumentan a favor de la hipótesis de que es la proteína soluble la que desencadena la patogénesis. La

formación de agregados puede ser una estrategia por la cual la célula secuestra las proteínas con poliQ mal plegadas, lo que reduce su capacidad para asociarse con otros componentes celulares.

Algunos de estos trabajos (Saudou *et al.*, 1998; Cummings *et al.*, 1999) sugerían una posible implicación del proteosoma en la EH. De hecho, que los agregados de HTT mutante estén ubiquitinados y se localicen junto a subunidades del proteosoma (DiFiglia *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1997; Sieradzan *et al.*, 1999; Wyttenbach *et al.*, 2000; Waelter *et al.*, 2001) ha llevado a pensar que éste es el responsable de su degradación. De acuerdo con esto, diversos grupos han encontrado que la inhibición del proteosoma conduce a un incremento en el número de células que contienen agregados (Scherzinger *et al.*, 1999; Wyttenbach *et al.*, 2000; Jana *et al.*, 2001; Waelter *et al.*, 2001), así como una inhibición de la desaparición de los mismos en un modelo transgénico condicional TetOff (Martín-Aparicio *et al.*, 2001).

En este sentido se ha observado que las proteínas propensas a agregarse, como la HTT mutada y las proteínas de la fibrosis quística, inhiben el sistema de la ubiquitina proteosoma (Bence *et al.*, 2001), y que esta inhibición altera a su vez la vida media de las proteínas envueltas en la apoptosis y en la supervivencia celular (Jana *et al.*, 2001). Sin embargo, en otros trabajos no se ha detectado cambios en la actividad del proteosoma en modelos celulares con

INTRODUCCIÓN

niveles bajos de expresión de la proteína mutante de la fibrosis quística (Gelman *et al.*, 2002), ni con poliQ de distintos tamaños (Ding *et al.*, 2002).

1.6.7.2.3. REVERSIBILIDAD DE LOS AGREGADOS Y DEL FENOTIPO PATOLÓGICO

Los estudios que se realizaron en el modelo transgénico condicional TetOff de la EH (Yamamoto *et al.*, 2000; Martín-Aparicio *et al.*, 2001) demuestran que el bloqueo de la expresión de la HTT mutante permite la recuperación del fenotipo patológico en ocho semanas, así como la desaparición de los agregados en tres semanas, en el animal, y cinco días, en el modelo en cultivo. Esto pone de manifiesto que las inclusiones son estructuras dinámicas y que se requiere un suministro constante de la proteína para la progresión de la enfermedad. Estos trabajos sugerían igualmente que los daños neurológicos podrían revertirse, al menos parcialmente.

1.7. DIAGNÓSTICO

Tradicionalmente, el diagnóstico de la EH se definía por la presencia de:

- Historia familiar positiva, con un patrón de herencia autosómico dominante.
- Disfunción motora progresiva que incluye a los movimientos voluntarios e involuntarios.
- Perturbación mental que incluye declive cognitivo, trastorno afectivo y/o cambios en la personalidad.

El diagnóstico de la EH se realiza principalmente mediante examen clínico. Donde se pone de manifiesto la presencia de atrofia del núcleo caudado y del putamen por tomografía computerizada (CT) o resonancia magnética por la imagen (MRI). La tomografía de emisión de positrones (PET) puede revelar la disminución de la captación y el metabolismo de la glucosa en el núcleo caudado antes de que la pérdida de tejido neuronal comience a ser evidente. El hallazgo de una expansión CAG por encima de 40 repeticiones confirma el diagnóstico de la EH.

INTRODUCCIÓN

1.7.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial de la EH es importante en la evaluación de los

Etiología	Comentarios
Disquinesia tardía	Efecto secundario de antipsicóticos
Corea de Sydenham	Tras infección por <i>Streptococcus</i> ; en el 20% de la fiebre reumática; niños
Lupus sistémico eritematoso	Corea en el 1-7% de los casos
Neurosífilis	Normalmente concomitante con infección por VIH
Hipertiroidismo	Corea en el 2% de los casos; normalmente adultos jóvenes
Corea medicamentosa	Litio, antiepilépticos, estimulantes, L-Dopa, estrógenos
Embarazo	Raro; aumenta el riesgo con una historia de corea de Sydenham
Policitemia vera	Corea en el 0,5-5% de los casos
Corea senil	Inicio tardío; puede ser indistinguible de la EH senil
Lesión del ganglio basal	Golpes, infección, tumor

Tabla 1. Enfermedades no hereditarias que se parecen a la EH.

Enfermedad	Comentarios
<i>Autosómica dominante</i> Atrofia dentadorrubropalidoluisiana (DRPLA)	Más común en Japón; expansión CAG en atrofina-1
EH-tipo 2	Clínicamente y patológicamente indistinguible de la EH; casi exclusiva de africanos; expansión CTG en yuxtofilina-3
Corea hereditaria benigna	Inicio en la adolescencia; ocasionalmente progresiva; cromosoma 14q
Enfermedad de Fahr (calcificación del ganglio basal idiopático) Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria	Cromosoma 14q 15% de los casos de Creutzfeldt-Jakob son dominantes; neuropatología esponjiforme; mutación en el gen PrP en el cromosoma 20p
Ataxia espinocerebelar 7 (SCA7)	Expansión CAG en el gen TBP en 6q27; corea con ataxia cerebelar
<i>Otras ataxias espinocerebelares</i> <i>Autosómica recesiva</i> Lipofuscinosis neuronal ceroide	Expansión CAG en SCA 2 y SCA 3 Trastornos del almacenamiento lisosomal; inicio adolescencia principalmente; mutaciones en ocho genes diferentes (CLN1-CLN8); forma adulta puede ser dominante o recesiva
Neurodegeneración asociada a pantotenato-quinasa	Acumulación anormal de hierro; “ojo de tigre” MRI; 50% de los casos mutaciones en PANK2
Enfermedad de Wilson	Metabolismo del cobre anormal; toxicidad hepática; anillos de Kayser-Fleischer; mutaciones en ATP7B
<i>Otras enfermedades hereditarias</i> Trastornos mitocondriales Neuroacantocitosis	Muchos tipos; herencia materna Acantocitos; corea-acantocitosis es recesiva; síndrome de McCleod está ligado al cromosoma X, mutación en el gen Xk; también existen formas dominantes

Tabla 2. Enfermedades hereditarias parecidas a la EH.

INTRODUCCIÓN

individuos clínicamente afectados que no tienen la mutación de la EH y en aquellos casos que originalmente se presentan como otros trastornos. En las tablas 1 y 2 se incluye una lista de las enfermedades tipo EH hereditarias y no hereditarias más frecuentes (Quinn & Schrag, 1998). Existe tratamiento específico para muchas de estas enfermedades, por ello la búsqueda de un diagnóstico definitivo es esencial.

1.7.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Desde el punto de vista técnico el diagnóstico de la enfermedad puede ser directo, analizando el número de repeticiones de la región CAG en el gen, o bien indirecto estudiando, mediante marcadores polimórficos del DNA, la segregación familiar del alelo mutado. También existen diferentes tipos de diagnósticos, si tenemos en cuenta el momento de la vida del individuo en que se realizan y su condición clínica. Así, el diagnóstico clínico o test diagnóstico es el que se realiza en un paciente que ya presenta síntomas y tiene por objeto confirmar o descartar la sospecha diagnóstica. En este caso, lo ideal es realizar una técnica directa ya que es la más sencilla y fiable. Por otra parte, este tipo de diagnóstico no tiene ninguna particularidad ético-legal especial, aparte de las habituales en la práctica de un diagnóstico genético (confidencialidad, etc.).

El diagnóstico presintomático o test predictivo es el que se realiza a un individuo que tiene riesgo de padecer la enfermedad, por tener un familiar afectado, pero que no presenta aún ningún síntoma. En este caso existen una serie de recomendaciones ético-legales de asociaciones y organismos internacionales que deben seguirse. También pueden realizarse el diagnóstico prenatal y pre-implantación en fetos y embriones en riesgo de padecer la enfermedad.

1.7.2.1. DIAGNÓSTICO DIRECTO: METODOLOGÍA

Consiste en la amplificación de la región del gen HD que contiene la expansión, mediante PCR. El tamaño de los alelos amplificados se determinan comparándolos con marcadores de pesos moleculares así como marcadores de alelos con número conocido de repeticiones, con los habituales controles negativos. Debe informarse el tamaño de los alelos referido al número de repeticiones CAG ininterrumpidas.

1.7.2.2. DIAGNÓSTICO INDIRECTO: METODOLOGÍA

Cuando una persona con riesgo de haber heredado el gen HD (hijo / hermano de un paciente) no desea conocer su condición de mutado o sano pero si quiere conocer la condición de su feto, mediante diagnóstico prenatal, puede recurrirse al diagnóstico indirecto con marcadores de DNA, próximos al gen HD.

Así, analizando los marcadores en el abuelo afectado y la abuela, en el progenitor en riesgo y el progenitor sano se puede predecir si un feto ha heredado el alelo HD procedente del abuelo sano o del afectado, arrojando un riesgo muy bajo (cerca de cero) en el primer caso (Figura 1B) o del 50% en el segundo caso (Figura 1A). Para que este tipo de diagnóstico sea lo más fiable posible, y el riesgo de recombinación sea bajo, es conveniente utilizar varios marcadores lo más próximos al gen (Carlock *et al.*, 1993).

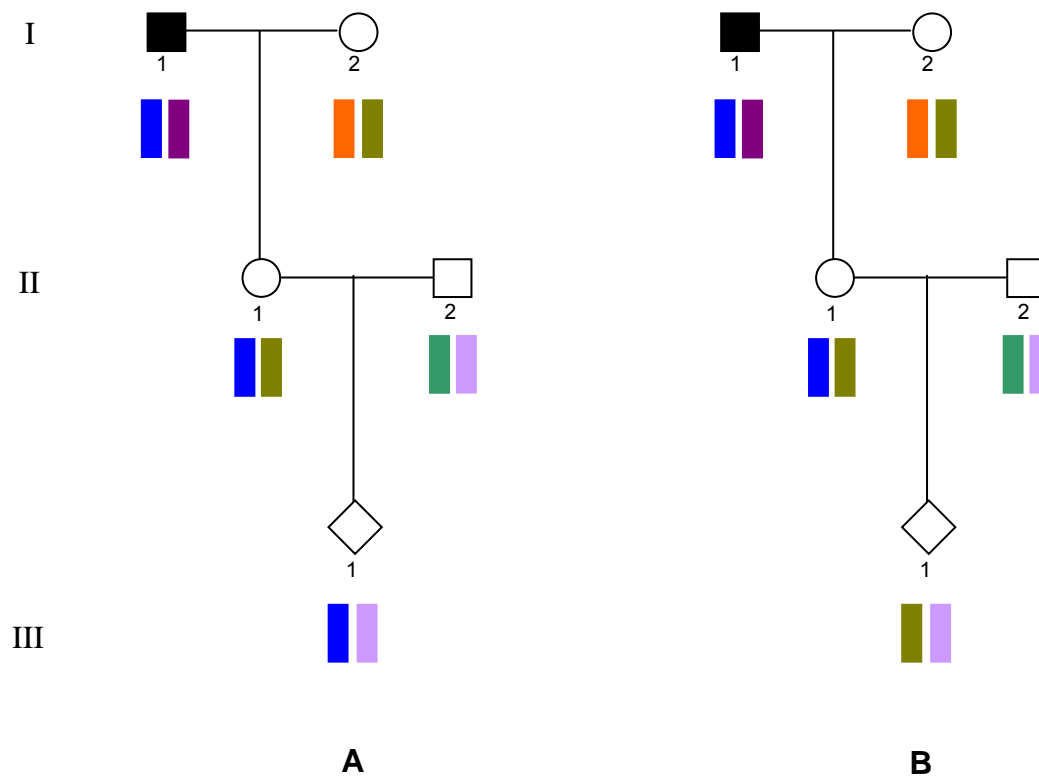


Fig. 1. Estudio indirecto de EH para diagnóstico prenatal sin someterse a test predictivo. A) El feto ha heredado el haplotipo ligado al cromosoma 4 del abuelo afectado: riesgo del 50% de estar afectado. B) El feto ha heredado el haplotipo ligado al cromosoma 4 del abuelo no afectado: riesgo cercano al 0% de estar afectado.

1.7.3. DIAGNÓSTICO PRENATAL

El diagnóstico prenatal suele realizarse en muestra de vellosidades coriales y la metodología a aplicar debe ser la misma que en el diagnóstico postnatal sobre sangre periférica. Sin embargo, conviene tener la precaución

INTRODUCCIÓN

habitual en el manejo de este tipo de muestras, para asegurarse que no existe contaminación con DNA materno. Para ello se debe proceder a la identificación morfológica de las vellosidades bajo lupa, así como, si es posible, realizar un control, mediante PCR de algún marcador o gen informativo en la madre.

1.7.4. CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES

En el momento actual la EH no tiene un tratamiento curativo ni paliativo eficaz. Por ello el conocer con años de antelación (test predictivo) la condición de portador de la mutación, y por tanto de la enfermedad, puede ser percibido por el individuo como una condena inexorable hacia la demencia, la invalidez, y una muerte prematura. Pero este conocimiento tiene, por otra parte, aspectos positivos como pueden ser una adecuada planificación de la vida personal, profesional y reproductiva (Hayes, 1992). Han sido muchos los estudios realizados sobre el impacto que produce en la vida de las personas con riesgo, el conocer su condición de mutado o no mutado (enfermo o sano) (Burson *et al.*, 2001; Hakimian, 2000). En estas personas hay que tener en cuenta que existe un alto riesgo de sufrir tendencia al suicidio al recibir un resultado adverso.

Por otra parte es preciso seguir controles periódicos y neurológicos en busca de los primeros síntomas de la enfermedad, pero además es muy

conveniente realizar un seguimiento a largo plazo de la persona diagnosticada ya que si se dispusiera de un tratamiento en el futuro, se le podría aplicar de forma inmediata.

Por todo ello, los diversos comités y organizaciones recomiendan unos requisitos mínimos para que una persona sea sometido a un test predictivo de EH:

- Mayoría de edad.
- Solicitud voluntaria.
- Equipo de apoyo multidisciplinario: psicólogo, neurólogo, genetista clínico.
- Consentimiento informado.
- Confidencialidad.
- Consejo genético.

Es imprescindible el consejo genético en un test predictivo (Harper *et al.*, 2000). También muy necesario para el paciente ya sintomático y sus familiares en el caso del test diagnóstico (Helle *et al.*, 2000).

1.8. TRATAMIENTO ACTUAL

No hay un tratamiento actual curativo para la EH. El tratamiento se dirige hacia la reducción de la corea y de los trastornos psiquiátricos. Siempre que se presente, la depresión se ha de tratar, preferentemente, con antidepresivos de menor efecto anticolinérgico, con inhibidores de la provisión de la serotonina (fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina o venlafaxina), nefazodona o trazodona (Baldessarini *et al.*, 1996).

El tratamiento de la corea se basa en el uso de inhibidores de los receptores D₂ de la dopamina, como neurolépticos del grupo de las fenotiacinas (mesoridacina, tioridacina, acetofenacina y perfenacina) o compuestos heterocíclicos (haloperidol, loxapina, molindona, pimocida y risperidona). Mientras tanto, debido a los importantes efectos colaterales de esos medicamentos, como la sedación, reducción de la función cognitiva, de la actividad motora y la hipotensión, su uso puede no ser justificable, excepto en casos de corea de gran amplitud y que causan caídas frecuentes (Baldessarini *et al.*, 1996). La clozapina es un neuroléptico atípico, inhibidor de los receptores D₁ de la dopamina, que puede proporcionar una discreta mejora de la corea y raramente produce discinesia tardía, pero su uso en la EH también es limitado debido a los efectos colaterales (Van Vugt *et al.*, 1997). Otras indicaciones para el uso de neurolépticos en la EH son las perturbaciones psicóticas (delirios y alucinaciones),

tratadas con dosis menores que las usadas en los trastornos psiquiátricos primarios y cuyo empleo puede suspenderse con la regresión de los síntomas (Standaert *et al.*, 1996).

Como los receptores D₂ de la dopamina presinápticos normalmente inhiben la liberación del glutamato en las vías córtico-estriatales excitantes, los neurolépticos aumentan la liberación del glutamato en el estriado, lo cual puede relacionarse con el desarrollo de la discinesia tardía, un trastorno neurológico clínica y patológicamente semejante a la corea de la EH, provocada por el uso crónico de neurolépticos (Tsai *et al.*, 1998). Además, tanto los neurolépticos convencionales como los atípicos producen un aumento de la actividad de los receptores del glutamato (Banerjee *et al.*, 1995). Por lo tanto, es posible que el uso crónico de neurolépticos en portadores de la EH contribuya a la pérdida neuronal.

Los medicamentos que inhiben la liberación de glutamato, como la lamotrigina y el riluzol, son capaces de disminuir la corea de la EH (Kremer *et al.*, 1999; Rosas *et al.*, 1999), así como las sustancias que inhiben los receptores del glutamato, como la remacemida (Doble, 1999).

1.9. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS.

1.9.1. TERAPIA A NIVEL DE DNA

Debido a la fuerte dependencia que existe entre el fenotipo de la EH y la longitud de la expansión trinucleotídica CAG, ha surgido la posibilidad de una estrategia terapéutica eficaz, deteniendo la expansión a nivel de DNA. Determinados estudios en ratones han sugerido que la herencia de transgenes expandidos de la secuencia CAG se mantienen estables después del nacimiento. Sin embargo, alrededor de las once semanas de vida, la expansión somática se observó en casi todos los tejidos del cuerpo y continúa a lo largo de toda la vida del animal (Kovtun & McMurray, 2001). La expansión dependiente de la edad es más prominente en el cerebro (Kovtun & McMurray, 2001; Mangiarini *et al.*, 1996). Así, es posible que los tejidos preferentemente afectados contengan más HTT y con una expansión más larga. Aunque este fenómeno no ha sido confirmado en humanos, hay un gran interés por determinar, si el aumento de las expansiones de poliglutamina dependientes de la edad, está relacionado con el desarrollo de la enfermedad.

Los esfuerzos iniciales por detener la expansión fueron entorpecidos por el escaso entendimiento del mecanismo genético. Así, estudios recientes han

confirmado que la expansión ocurre durante la reparación del DNA y se encuentra implicado un sistema de reparación, MSH2, en el proceso de la mutación (Kovtun & McMurray, 2001). Se ha observado tras la unión de ratones transgénicos hHD (R6/1) con ratones MSH2^{-/-}, que la ausencia de MSH2 detuvo completamente la expansión en la línea germinal y la expansión somática dependiente de la edad (Kovtun & McMurray, 2001; Manley *et al.*, 1999).

1.9.2. TERAPIA A NIVEL DE PROTEÍNA

Se ha puesto mucho énfasis en desarrollar estrategias terapéuticas que compensaran o previnieran la toxicidad inducida por la HTT mutada.

1.9.2.1. INHIBIR LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE HTT

Se están desarrollando anticuerpos y moléculas pequeñas inhibitoras para bloquear la agregación. Por ejemplo, anticuerpos de cadena simple (Fv) reducen el número de agregados visibles en células EH (Lecerf *et al.*, 2001). De forma similar, están surgiendo moléculas pequeñas y péptidos inhibidores (Heiser *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2001; Sittler *et al.*, 2001; Kazantsev *et al.*, 2002) de la

INTRODUCCIÓN

agregación mediada por HTT. Se unen específicamente a HTT, reduciendo la agregación y aumentando la supervivencia de la célula.

Se sabe que la HTT puede regular la transcripción de BDNF (Zuccato *et al.*, 2001) pero su disminución por la formación de agregados podría contribuir a la muerte neuronal. Estos datos sugieren que el tratamiento con BDNF podría mejorar la supervivencia de la neurona.

Un estudio reciente *in vitro* ha demostrado que varios disacáridos pueden inhibir la agregación de poliQ y aumentar la supervivencia de los modelos celulares EH. La administración oral de trehalosa, el disacárido más efectivo, disminuyó los agregados en cerebro e hígado, mejoró la disfunción motora y aumentó la expectativa de vida en ratones transgénicos. De esta forma, surge una posible estrategia terapéutica (Tanaka *et al.*, 2004).

1.9.2.2. SUPLIR EL ESTRÉS OXIDATIVO

La interrupción de la función mitocondrial y la depleción de ATP juega un papel en la EH. Por lo tanto, se podría restablecer el metabolismo energético mediante la restauración de los niveles de ATP. De hecho, se ha demostrado que, ratones transgénicos R6/2 y ratones tratados con ácido 3-nitropropiónico

alimentados con una dieta rica en creatina tuvieron una menor atrofia del estriado y formación de inclusiones neuronales (Ferrante *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 1998). A pesar de la mejora en animales, el suplemento de creatina no es eficaz en humanos (Verbesse *et al.*, 2003; Tabrizi *et al.*, 2003).

Se ha evaluado la eficacia del coenzima Q10 en pacientes con la EH pero sin resultados significativos en el retraso del declive funcional en la EH (Huntington Study Group, 2001). Sin embargo, un estudio realizado en ratones transgénicos R6/2, la administración de coenzima Q10 retrasó la atrofia cerebral, las alteraciones motoras, la pérdida de peso y las inclusiones neuronales (Ferrante *et al.*, 2002).

No obstante, estos agentes podrían ser eficaces en combinación con otros tratamientos.

1.9.2.3. INHIBICIÓN DE CASPASAS

Se ha especulado que el bloqueo de algún paso en la muerte celular programada podría mejorar el efecto causado en las neuronas con EH (Friedlander, 2003). De hecho, se están realizando ensayos clínicos para

INTRODUCCIÓN

demostrar la eficacia de la minociclina, inhibidor de caspasa 1 y 3 y que ha aumentado la supervivencia en ratones transgénicos (Chen *et al.*, 2000).

1.9.2.4. TRASPLANTE

Otra forma de tratamiento que va despertando interés es el trasplante de tejido cerebral embrionario o fetal (Kopyov *et al.*, 1998; Watts & Dunnett, 2000). Todavía existen importantes cuestiones técnicas y éticas que dificultan la terapia en esta dirección. Una alternativa sería el cultivo de tejidos de células neuronales viables para el trasplante (Hurlbert *et al.*, 1999).

1.9.2.5. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA HTT MUTADA

Una estrategia ideal sería eliminar la expresión de la proteína mutante antes de que los efectos tóxicos ocurran. Tal estrategia podría demostrarse eficaz porque la función no parece ser sensible (dentro de los límites) a la cantidad de producto del gen expresado en los pacientes con la EH (Yamamoto *et al.*, 2000). Como la HTT normal es necesaria para el desarrollo (Nasir *et al.*, 1995; Dragatsis *et al.*, 2000), la inhibición del alelo mutado resultaría beneficioso siempre y

INTRODUCCIÓN

cuando la expresión del alelo normal se preservara. Una de las estrategias informadas es el uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el promotor del primer exón del gen HD (Boado *et al.*, 2000; Haque & Isacson, 1997).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo que afecta de 3 a 7 por 100.000 individuos en Europa occidental. Esta enfermedad se manifiesta, en la mayoría de los casos, en la cuarta década de la vida. Tiene un patrón de herencia autosómico dominante, la prole de un individuo afectado tiene un 50% de probabilidad de heredar la enfermedad. En 1993 se relacionó por primera vez la alteración de un gen con esta enfermedad. A partir del descubrimiento de las bases genéticas de esta enfermedad, se han desarrollado una serie de test predictivos que permiten determinar si el individuo ha heredado dicha alteración genética. Estos test pueden ser interpretados por el equipo de profesionales adecuado para llevar a cabo un consejo genético al paciente.

El defecto genético consiste en una expansión del triplete CAG igual o mayor a 40 repeticiones en el extremo 5' del gen HD localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Pero existe un rango de baja penetrancia que se encuentra entre 36 y 39 repeticiones lo que requiere una medida exacta de la longitud de la expansión CAG.

En este sentido, el objetivo de esta tesis doctoral ha consistido en la búsqueda de un método que permita el cómputo exacto de las repeticiones CAG.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Con este fin, el trabajo de investigación presente se ha desarrollado en base a los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto de un método de determinación del número exacto de repeticiones CAG.
2. Amplificación y secuenciación de la región CAG en el gen HD.
3. Validación del método realizado, análisis molecular tanto de individuos sanos como con sospecha de enfermedad de Huntington.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES

En el presente estudio hemos analizado 155 muestras de sangre, de las cuales 100 procedían de individuos, supuestamente sanos, que fueron remitidos a nuestro centro por una patología diferente a la estudiada; 36 individuos con sospecha de enfermedad de Huntington, tras la valoración de un especialista en Neurología; y 19 individuos con riesgo de heredar la enfermedad. El diagnóstico predictivo fue realizado únicamente a pacientes mayores de 18 años, tras solicitud voluntaria y consentimiento informado. El análisis a menores de 18 años se llevó a cabo cuando había síntomas clínicos de la enfermedad y el neurólogo requería el análisis para la confirmación del diagnóstico.

3.2. EXTRACCIÓN DEL DNA

El DNA genómico fue extraído a partir de los leucocitos de 200 μL de sangre periférica utilizando QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen), según las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del DNA se realizó midiendo la absorbancia (A) a 260 nm en un espectrofotómetro UV (UV-1603 Shimadzu Spectrophotometer). Una unidad de absorbancia equivale, aproximadamente, a 50 ng/ μL de DNA de doble hebra. Para determinar la pureza del DNA se calculó la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (A_{260}/A_{280}) que debe estar entre 1,7 y 1,9. Si es menor indica contaminación por proteínas.

3.3. AMPLIFICACIÓN DE LA EXPANSIÓN CAG EN EL GEN HD.

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en la amplificación de una región del DNA de tamaño y secuencia específicos (Mullis *et al.*, 1986). Se utilizaron cuatro cebadores sintéticos de unos 15 a 20 nucleótidos, complementarios a las zonas flanqueantes de las regiones

MATERIALES Y MÉTODOS

que queríamos amplificar: la región CAG sola, la región CCG sola y la región CAG + CCG (Fig. 2). La secuencia de los cebadores se diseñó de tal forma que evitara la formación de híbridos, de estructuras secundarias y con una distribución equilibrada de bases. Los cebadores indirectos se marcaron con el fluoróforo, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), en el extremo 5'.

Secuencia de los cebadores:

HDF1 5'-TTC GAG TCC CTC AAG TCC TTC-3'

HDR1 5'-GGC GGT GGC GGC TGT **CG**-3'

HDF2 5'-CAA CAG CCG CCA CCG **AC**-3'

HDR2 5'-GGC TGA GGA AGC TGA GGA G-3'

Las bases en negrita y subrayadas son mutaciones que se han introducido deliberadamente en el diseño de la secuencia de los cebadores HDR1 Y HDF2.

MATERIALES Y MÉTODOS

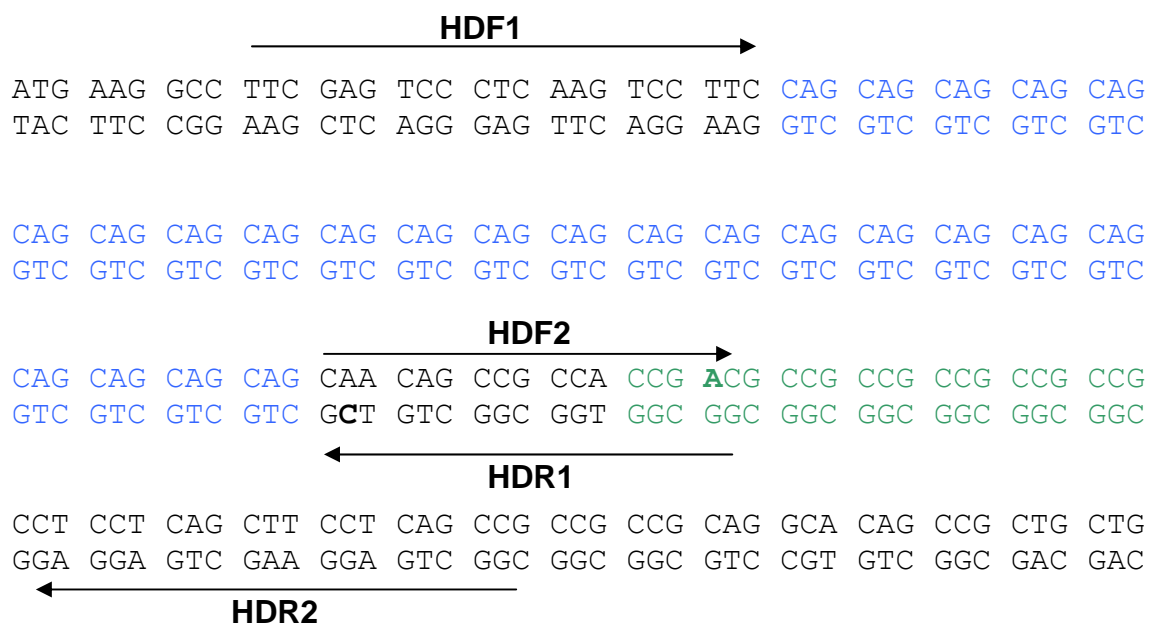


Fig. 2. Región del gen HD donde se encuentra la expansión repetitiva causante de la EH (en azul), la región adyacente polimórfica (en verde) y los cebadores empleados en la amplificación.

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Tubos de 200 µL para PCR (MicroAmp® Applied Biosystems).
- dNTPs 10 mM de cada uno (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 7-deaza-dGTP) (Applied Biosystems).
- 4 cebadores 1,1 µM de cada uno (Applied Biosystems).

- 10X PCR Buffer II (Applied Biosystems).
- MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems).
- DNA polimerasa Ampli Taq Gold™ (5 U/μL) (Applied Biosystems).
- DMSO (dimetilsulfóxido) (Panreac Química SA).
- Formamida desionizada (Hi Di™ Applied Biosystems).
- Termociclador GeneAmp PCR system 2400-Applied Biosystems.

Técnica:

Con el fin de poner a punto cada una de las reacciones de amplificación para cada ensayo, se estudió un rango de valores para los diferentes parámetros de la mezcla de reacción por separado, en un volumen total de 25 μL. Así, el MgCl₂ se estudió en un rango de 1 a 3 mM; el efecto de la adición de dimetilsulfóxido (DMSO) se midió en un rango de 0 a 10%; el efecto de la adición de la formamida a una concentración de 30 mg/L y se utilizó una concentración de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) de 0,2 mM para cada uno de ellos, incluyéndose 7-deaza-dGTP en diferentes proporciones 3:1, 1:1, 1:3 (dGTP:7-deaza-dGTP). Por último, se estudió la cantidad de DNA a 10, 25, 50 y 100 ng.

Por otro lado, se realizó la puesta a punto de los parámetros técnicos óptimos para el desarrollo de la amplificación. En este sentido se estudió la temperatura de hibridación en un rango de 55 a 65°C para el siguiente programa:

MATERIALES Y MÉTODOS

desnaturalización inicial de 3 min a 96°C, 35 ciclos a 94°C durante 30 s, con un rango de temperatura de 55 a 65°C durante 30 s y a 72°C durante 2 min; y una extensión final a 72°C durante 10 min. Se varió el número de ciclos de 30 a 40 ciclos. Se comprobó la eficacia del siguiente programa: después de una desnaturalización inicial de 2 min a 96°C, hay 6 ciclos a 94°C durante 30 s, 68°C durante 30 s y 72°C durante 2 min (en cada ciclo se disminuirá la temperatura en 2°C), seguidos de 29 ciclos a 92°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; y una extensión final a 72°C durante 10 min.

Las muestras obtenidas pueden ser usadas inmediatamente o guardadas a -20°C hasta su uso.

3.4. ELECTROFORESIS CAPILAR Y DETECCIÓN FLUORESCENTE

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM® 310 de Applied Biosystems.

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Formamida desionizada (Hi Di™ Applied Biosystems).
- Marcador de peso molecular (GeneScan®-500 [TAMRA]™ Applied Biosystems).
- Buffer con EDTA (ABI PRISM® 310 10X).
- POP-4™ (Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystems).
- Capilar de sílice (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Capillary de 47 cm de longitud, 50 µm de diámetro, marcado en verde).
- Jeringa 1 mL.
- Dos viales 4 mL para el buffer y el agua.
- Gradilla 48 pocillos.
- Tubos 0,5 mL (Genetic Analyzer Applied Biosystems).
- Tapones (Applied Biosystems).
- Microcentrifuga (Centrifuge 5410 eppendorf).
- Termociclador (GeneAmp® PCR System 9600).
- Analizador genético ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems).

3.4.1. PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Previamente a la electroforesis se mezclaron en un tubo ABI 310 de 0,5 mL: 1 μ L del producto amplificado, 18,5 μ L de formamida desionizada y 0,5 μ L del marcador de pesos moleculares (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500 pb) marcado con el fluoróforo TAMRA. Las muestras se llevaron al termociclador a 95°C para su desnaturalización, durante 3 min e inmediatamente después se pusieron en hielo.

3.4.2. PREPARACIÓN DEL EQUIPO

Antes de inyectar las muestras en el analizador es necesario realizar los siguientes pasos:

1. Establecer comunicación entre el ordenador y el analizador.
2. Abrir el software de recogida de datos "ABI PRISM™ 310 Collection". Este programa recoge el dato crudo del análisis de los fragmentos en cada carrera. El dato crudo es la fluorescencia detectada por la cámara CCD de los fragmentos marcados, separados en el capilar por

electroforesis y excitados por el láser al pasar por la ventana de detección.

3. Colocar el bloque de metacrilato limpio y seco.
4. Colocar el capilar. Antes de su colocación se limpia la ventana del capilar con un papel embebido en etanol absoluto. Tras limpiar la ventana se introduce el capilar en la válvula que lo conecta con el bloque de metacrilato hasta llegar a la primera intersección y se aprieta bien la válvula; es importante no rebasar esta primera intersección para que el polímero pueda penetrar en el capilar. A continuación se sitúa la zona de lectura del capilar en la ventana del láser y se cierra la puerta del láser, se introduce el otro extremo en la parte que contiene el electrodo negativo o cátodo y se desliza hasta que queden a la misma altura. Por último se sujeta el capilar con una cinta adhesiva contra la placa térmica.
5. Establecer la posición de la jeringa y el “autosampler”. Calibración del “autosampler”.
6. Preparar 15 mL de buffer 1X y llenar los viales de buffer del cátodo y ánodo hasta la marca.

MATERIALES Y MÉTODOS

7. Relleno del capilar y del bloque de metacrilato con el polímero. El polímero utilizado para el análisis de fragmentos es el POP-4 y se mantiene a 4-8°C. Media hora antes de su uso, se saca del frigorífico para que se atempere. Con la jeringa bien limpia se toma el volumen de polímero necesario en función del número de muestras, se enrosca bien para evitar pérdida de polímero y se llenan los conductos del bloque de metacrilato evitando la formación de burbujas de aire.

3.4.3. PROGRAMACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.4.3.1. HOJA DE MUESTRAS (“SAMPLE SHEET”)

Una vez abierto el programa ABI PRISM® 310 Collection se abre una nueva hoja de muestras donde se introducirá los datos de cada muestra y su posición en la gradilla. Se indicará que trabajaremos con cuatro colores. Se guarda la hoja en su carpeta correspondiente y se procede a la realización de la lista de inyección.

3.4.3.2. LISTA DE INYECCIÓN

En esta lista se incorpora la hoja de muestras creada, en ella es posible modificar el orden de inyección de las muestras e incluso repetir algunas de las muestras, cambiando alguno de los parámetros, como el tiempo de inyección. La primera columna indica los datos de las muestras. La segunda columna especifica el módulo de análisis el cual contiene las funciones específicas ejecutadas para el proceso de análisis de las muestras. Para nuestro caso el módulo seleccionado es el GS STR POP4 (1mL) C.md4. Este módulo establece unas condiciones de electroforesis que pueden ser modificadas:

- Voltaje y tiempo de inyección (para inyección electrocinética): ambos parámetros pueden ser variados para regular la cantidad de DNA que entre en el capilar. Así, en el caso de obtener una señal débil en una muestra es posible aumentar el tiempo de inyección para permitir que se inyecte más cantidad de producto amplificado al capilar y que aumente la señal de fluorescencia. No obstante, un tiempo de inyección excesivo puede originar una pérdida de resolución. Se estimó un tiempo de 8 segundos.

- Voltaje de electroforesis: el voltaje estándar es 319 V/cm para fragmentos analizados utilizando el polímero POP-4. Para un capilar

MATERIALES Y MÉTODOS

de 47 cm esto supone un voltaje total de 15 KV y la corriente a este voltaje es de 7-9 μ A. Bajo estas condiciones electroforéticas el tiempo necesario para que un fragmento de 400 pb llegue a la ventana de detección es de unos 25 min aproximadamente.

- Temperatura de electroforesis: para análisis de fragmentos esta temperatura debe ser de 60°C.
- Tiempo de electroforesis: normalmente el tiempo de electroforesis programado es un 10% superior a la media del tiempo necesario para que migre el fragmento de mayor tamaño que nos interese. Se estimó un tiempo de 30 min.

Antes de comenzar la inyección de las muestras se llevan a cabo dos funciones en el analizador: primero relleno del capilar (“Seq fill capillary”) y a continuación el test de los cuatro colores (“Test CCD 4-Color”) cuya función es comprobar que la ventana del capilar está limpia y colocada correctamente. Este test tiene una duración de 5 minutos y en el debemos comprobar que la línea basal de los cuatro colores está entre 800 y 2500 en escala vertical (intensidad de fluorescencia). Una vez completada la lista de inyección y habiéndose alcanzado la temperatura de electroforesis, se inicia el análisis pulsando el comando “run”.

3.4.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los fragmentos se analizaron con el filtro C y su matriz correspondiente (matriz matemática que corrige el solapamiento espectral de la emisión fluorescente) GS_Matriz_C.mtx. Se utilizó el programa ABI PRISM® GeneScan v3.7.1 (Applied Biosystems) para determinar con exactitud el tamaño. Esto es posible gracias a la comparación de la movilidad electroforética de cada producto de amplificación con la curva de calibración creada con los fragmentos del estándar analizados simultáneamente en cada muestra. Se utilizó el programa ABI PRISM® GeneMapper™ v3.0 (Applied Biosystems) para obtener el número exacto de repeticiones CAG del gen HD.

3.5. SECUENCIACIÓN

Se realizó la secuenciación de las muestras que presentaban los dos alelos con el mismo número de repeticiones, homocigotos.

3.5.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS SELECCIONADOS DE DNA

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Tubos de 0,2 mL para PCR (MicroAmp® Applied Biosystems).
- 2 cebadores 1,1 μ M cada uno (Applied Biosystems).
- dNTPs 10 mM de cada uno (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 7-deaza-dGTP) (Applied Biosystems).
- 10X PCR Buffer II (Applied Biosystems).
- MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems).
- DNA polimerasa Ampli Taq Gold™ (5 U/ μ L) (Applied Biosystems).
- DMSO (Panreac Química SA).
- Termociclador GeneAmp PCR system 2400-Applied Biosystems.

Secuencia de los cebadores:

En el diseño de los cebadores para la secuenciación se tuvo especial atención en la homología de los cebadores con la secuencia diana de DNA y en el contenido CG. Las secuencias de los cebadores se seleccionaron evitando la formación de híbridos y estructuras secundarias.

Los cebadores usados fueron:

HDFS: 5'- CTC CGG GGA CTG CCG TGC CG – 3'

HDRS: 5'- AGC GGC TCC TCA GCC ACA GC – 3'

Técnica:

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, que contenía: 5 μ L de tampón 10X para la DNA polimerasa, 4 μ L de dNTP 10 mM (con una proporción final de 1:3 dGTP:7-deaza-GTP), 3 μ L de MgCl₂ 25 mM, 9 μ L de HDRS 1,1 μ M, 9 μ L de HDFS 1,1 μ M, 3 μ L de DMSO, 0,5 μ L Taq polimerasa y 100 ng de DNA.

Condiciones de amplificación:

96°C	3 min	1 ciclo	Desnaturalización inicial
94°C	30 s		
65°C	30 s	40 ciclos	Amplificación
72°C	2 min		
72°C	10 min	1 ciclo	Extensión final

3.5.2. PREPARACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO PARA SECUENCIACIÓN

3.5.2.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Agarosa (Sigma ®).
- TAE 1X.
- Buffer de carga 6X Azul/Naranja (G190A, Promega).
- Bromuro de etidio (10 mg/mL) (Sigma®).
- Marcador de peso molecular (Lambda DNA/Hind III, Promega).

Equipo:

- Cubeta de electroforesis (SCIE-PLAS).
- Fuente de alimentación (BIO RAD Power Pac 1000).
- Transiluminador UV.
- Horno microondas.
- Careta protección UV.

Técnica:

1. Se preparó una solución de agarosa al 1,5% en TAE 1X. Se calentó en un horno microondas hasta la fundición de la agarosa.
2. Se ensambló la cubeta y el peine.
3. Se dejó enfriar la solución de agarosa hasta 55°C aproximadamente. Se vertió sobre la cubeta y se eliminaron las burbujas.
4. Se añadió TAE 1X sobre la cubeta hasta cubrir el gel.
5. Se cargó cada pocillo con la mezcla de cada producto de PCR (50 μ L) y 10 μ L de buffer de carga.
6. Se realizó la electroforesis a 85 v, durante 30 min.
7. Se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0,5 μ g/mL durante 20 min.
8. Las bandas fueron visualizadas iluminando el gel con luz UV.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.2.2. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- INa 6 M (Sigma®).
- Resina.
- Buffer de lavado: 80 mL etanol más 20 mL (Tris HCl 20 mM + ClNa 10 mM).

Equipo:

- Cuchillas estériles.
- Tubos eppendorf de 1 mL (Soria Genlab S.A).
- Baño caliente a 55°C.
- Microcentrifuga (Eppendorf Centrifuge 5410).

Técnica:

1. Se cortó la banda con una cuchilla, se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se pesó.
2. Se añadió 3 vol. de INa 6 M y se incubó a 55°C hasta la fusión de la agarosa.
3. Se resuspendió la resina agitando en vortex. Se añadió 5 μ L de resina.
4. Se mezcló bien y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente mezclando por inversión cada 1-2 minutos.
5. Se centrifugó durante 30 s.
6. Se descartó el sobrenadante, pipeteando con cuidado de no tocar la resina.
7. Se centrifugó durante 30 s y se eliminó el sobrenadante.
8. Se repitió el paso 7 y 8 dos veces más.

MATERIALES Y MÉTODOS

9. Se resuspendió el pellet en 25 μL de agua desionizada estéril.
10. Se añadió 400 μL de buffer de lavado y se resuspendió el pellet completamente.
11. Se centrifugó durante 30 s y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo estéril.
12. Se resuspendió el pellet en 25 μL de agua desionizada estéril.
13. Se centrifugó durante 30 s y se transfirió el sobrenadante al mismo tubo del paso 11.

A continuación, se realizó la purificación utilizando las columnas Microcon 100 (Millipore®), mediante el siguiente procedimiento:

- Ensamblar la columna Microcon 100 de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se añade 400 μL de agua desionizada estéril al interior del filtro Microcon.
- Se añade la totalidad del producto de PCR.

- Se centrifuga durante 10 min a 2500 g.

- Se descarta el filtrado y se vuelve a añadir 400 μL de agua para la etapa de lavado.

- Se añade 50 μL de agua desionizada estéril pipeteando varias veces sobre la superficie del filtro. Invertir el filtro (colocándolo sobre un tubo nuevo).

- Se centrifuga a 10.000 g durante 3 min.

- Se descarta el filtro y queda lista la muestra para el siguiente paso. Almacenar a 4°C.

3.5.3. PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Esta técnica se basa en el uso de didesoxinucleótidos (ddCTP, ddATP, ddGTP, ddTTP) como terminadores en la amplificación de un fragmento de DNA, lo que dará lugar a múltiples fragmentos que posteriormente serán separados por electroforesis capilar y detección fluorescente (Sanger *et al.*, 1977; Heiner *et al.*,

MATERIALES Y MÉTODOS

1998; Gerstner *et al.*, 1995; Roseblun *et al.*, 1997). Cada terminador está marcado con un fluorocromo de distinto color (Tabla 3).

TERMINADOR	FLUOROCROMO	Color observado en el equipo ABI PRISM 3100
C	BigDye® 1	Azul
A	BigDye® 2	Verde
G	BigDye® 3	Negro
T	BigDye® 4	Rojo

Tabla 3. Asignación de un color a cada terminador.

Reactivos:

- Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.
- Cebadores HDRS y HDFS 1 μ M.
- Producto de PCR.

Se mezcló, para un volumen final de 10 μ L, en un tubo de PCR: 4 μ L de BigDye Terminator Mix, 3 μ L de cebador 1 μ M, 3 μ L de producto de PCR. Se colocaron en el termociclador con el programa siguiente:

96°C	1min	1 ciclo	Desnaturalización inicial
96°C	10s		Desnaturalización
50°C	5s	25 ciclos	Hibridación
60°C	4min		Extensión

3.5.3.1. ELIMINACIÓN DE LOS DIDESOXINUCLEÓTIDOS LIBRES

Una vez terminada la reacción se eliminaron los didesoxinucleótidos libres siguiendo el método de precipitación con etanol y acetato sódico, que consta de las siguientes etapas:

- Preparar la solución de etanol / acetato sódico mezclando de la siguiente forma, para cada muestra: 3 μL de acetato sódico 3 M, pH 4,6; 62,5 μL de etanol absoluto 95% y 14,5 μL de agua desionizada estéril.
- Añadir 80 μL de la solución etanol / acetato sódico a los 10 μL de la reacción de secuenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos para que precipiten los productos secuenciados.
- Centrifugar durante 20 minutos a la máxima potencia (13.000 rpm).
- Eliminar el sobrenadante al máximo.
- Añadir 250 μ L de etanol 70% y mezclar brevemente.
- Centrifugar durante 5 minutos a la máxima potencia (13.000 rpm).
- Eliminar el etanol al máximo.
- Secar el pellet: tubo abierto en estufa 37°C durante 5 minutos. Se puede almacenar el pellet seco a -20°C.

Para la electroforesis el pellet se resuspendió en 20 μ L de formamida y se llevó a 94°C durante 3 minutos.

3.5.4. ELECTROFORESIS CAPILAR

Las muestras secuenciadas con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing fueron analizadas por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM® 3100-Avant de Applied Biosystems.

3.5.4.1. PREPARACIÓN DEL EQUIPO

- Establecer comunicación entre el ordenador y el analizador genético: primero se enciende el ordenador y automáticamente se cargarán dos programas, OrbixWeb™ Daemon que establece la comunicación entre Windows NT® OS y Data Collection Software; y AEServer. Y segundo, se enciende el analizador genético que automáticamente realiza la calibración del cargador de la gradilla.

- Abrir el software de recogida de datos Data Collection.

- Colocar los dos bloques limpios y secos: el bloque superior posee las dos jeringas, una grande con una capacidad de 5 mL encargada de rellenar la jeringa pequeña y el bloque; y otra pequeña de 250 µL

MATERIALES Y MÉTODOS

encargada de rellenar el capilar; el bloque inferior contiene el ánodo con la reserva de buffer.

- Colocar el array (serie de cuatro capilares que permite la inyección electrocinética de cuatro muestras simultáneamente) de 36 cm de longitud. Este array lleva incorporado el electrodo que es lo primero que se inserta, se colocan las pestañas que sujetan los capilares en la placa térmica, se inserta la célula de detección a la ventana del láser y por último, se introduce el extremo del array en el bloque superior.

- Preparar 25 mL de buffer 1X (ABI PRISM® 3100 10X Running Buffer with EDTA) y llenar los viales de buffer del cátodo y ánodo hasta la marca.

- Llenar de agua desionizada estéril los tres viales destinados a este fin hasta la marca.

- Rellenar el bloque superior e inferior, evitando la formación de burbujas en los bloques y en el tubo conector de los bloques, con polímero POP-4.

- Rellenar el array y realizar la calibración espacial que permite a la cámara CCD conocer la posición de los cuatro capilares.

3.5.4.2. PROGRAMACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se identifica la muestra y se introducen los datos requeridos por el analizador genético para realizar la electroforesis de las muestras (edición de la placa), que son los siguientes:

- Modulo: UltraSeq_36POP4 con los siguientes parámetros
 - Temperatura: 55°C
 - Tiempo de inyección: 7 s
 - Voltaje de inyección: 1 kV
 - Voltaje de electroforesis: 15 kV
 - Tiempo de electroforesis: 1700 s
- Filtro: Z
- Movilidad: DT3100POP4LR(BDv3)v1.mob

3.5.4.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Las muestras fueron analizadas con el software ABI PRISM® Sequencing Analysis v3.7 que identifica cada base y el orden que llevan. Este programa, además, marca con una “N” aquellas posiciones en las que haya duda sobre su identificación (heterocigotos, migración desigual de una base...).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. AMPLIFICACIÓN DE LA EXPANSIÓN CAG

La amplificación se llevó a cabo en tres reacciones independientes, mediante las cuales se obtuvo el cómputo: de los tripletes CAG, de los tripletes CCG y de la suma de los dos.

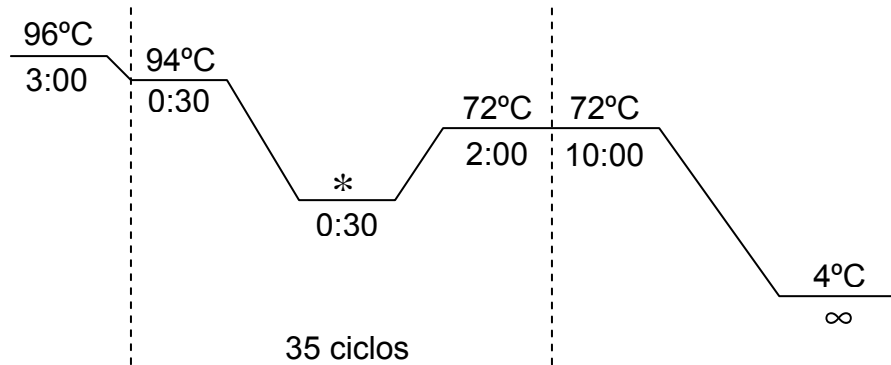
Para determinar las condiciones óptimas de amplificación que permitan obtener una adecuada cantidad de producto y generar una buena señal, se realizaron amplificaciones a diferentes temperaturas de hibridación (55, 58, 60 y 65°C), distintas concentraciones de MgCl₂ (1; 1,5; 2 y 3 mM), diferentes proporciones de dGTP:7-deaza-dGTP (3:0, 3:1, 1:1 y 1:3), distintas concentraciones de DMSO (6, 8 y 10%), adición de formamida a 30 mg/L, diferentes cantidades de DNA (10, 25 y 50 ng) y a distintos ciclos (30, 35 y 40).

1. Temperatura de hibridación.

Se determinó la temperatura de hibridación para cada par de cebadores, con las siguientes condiciones: tampón 1X para la Taq polimerasa, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada cebador, 1,25 U Taq polimerasa, 50 ng de

RESULTADOS

DNA y cantidad suficiente de agua desionizada estéril para un volumen final de 25 μ L. Se programó el termociclador con los siguientes parámetros:



La temperatura de hibridación (*) se comprobó a 55°C, 58°C, 60°C y 65°C. Utilizando HDF1 y HDR1 hubo amplificación, a 55°C y 58°C, obteniéndose un resultado más óptimo a 55°C (Fig. 3). Para amplificar la región CAG junto a la CCG con los cebadores HDF1 y HDR2 se obtuvo un mejor resultado a 58°C (Fig. 4), no hubo amplificación a 55°C ni a 65°C. La temperatura de hibridación más óptima para HDF2 y HDR2 que amplifica los tripletes CCG fue de 60°C (Fig. 5). No se obtuvo amplificación a 55°C y 65°C.

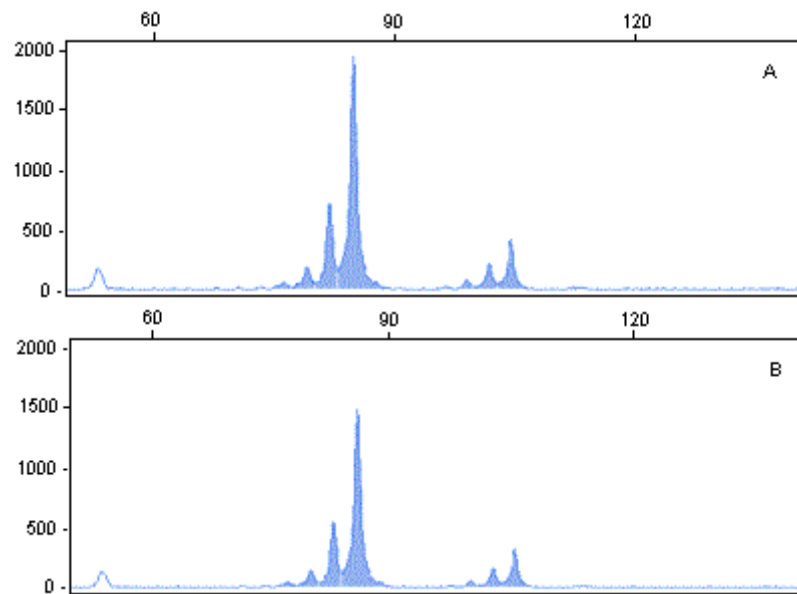


Fig. 3. Amplificación de la expansión CAG en el gen HD utilizando los cebadores HDF1 y HDR1: A) Temperatura de hibridación 55°C; B) Temperatura de hibridación 58°C.

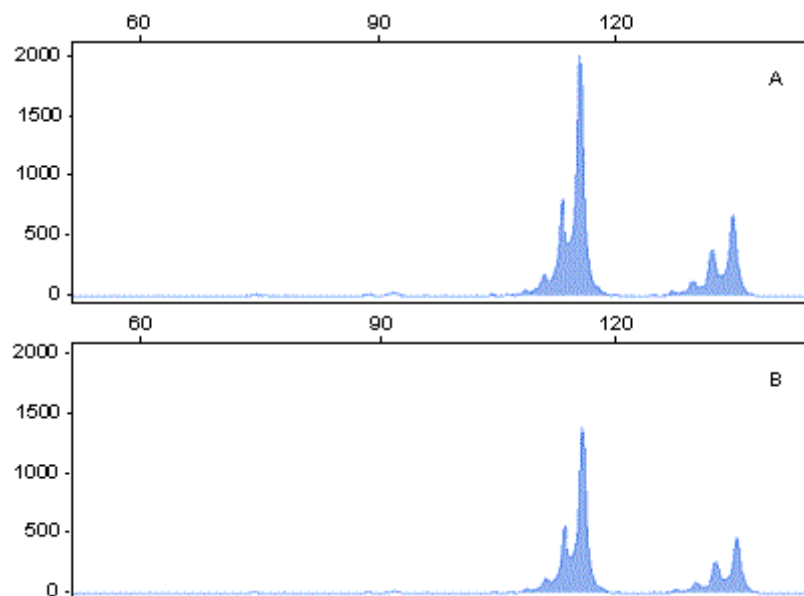


Fig. 4. Amplificación de la región CAG + CCG en el gen HD utilizando los cebadores HDF1 y HDR2: A) Temperatura de hibridación 58°C; B) Temperatura de hibridación 60°C.

RESULTADOS

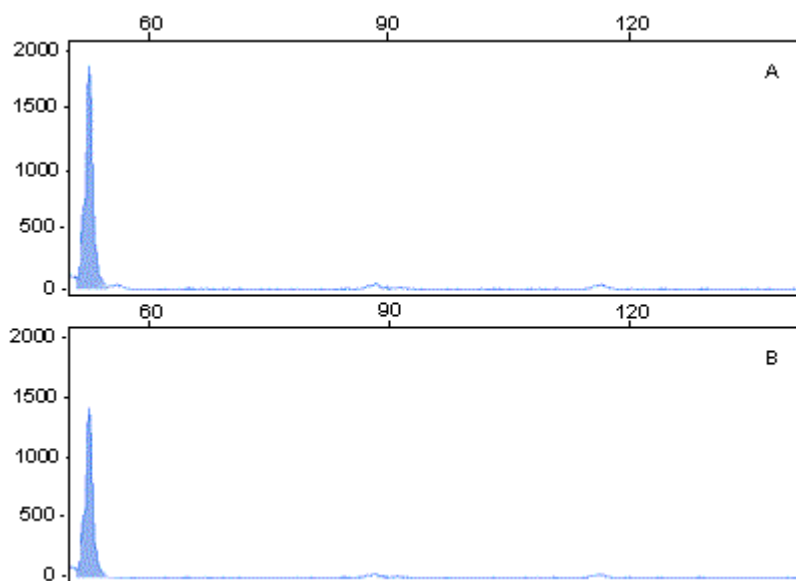


Fig. 5. Amplificación de la zona CCG sola usando los cebadores HDF2 y HDR2. A) Temperatura de hibridación 60°C. B) Temperatura de hibridación 58°C.

2. Variación de la concentración de MgCl₂.

Una vez obtenidas las temperaturas óptimas de hibridación se varió la concentración de MgCl₂: 1; 1,5; 2 y 3 mM. Los parámetros de amplificación se mantuvieron fijos (50 ng de DNA, una concentración de cebadores de 0,2 μM, 200 μM de dNTP y 1,25 U de Taq polimerasa). A 55°C de temperatura de hibridación y 35 ciclos, con el programa anteriormente expuesto, se obtuvo una mayor señal a la concentración de MgCl₂ 1,5 mM (Fig. 6).

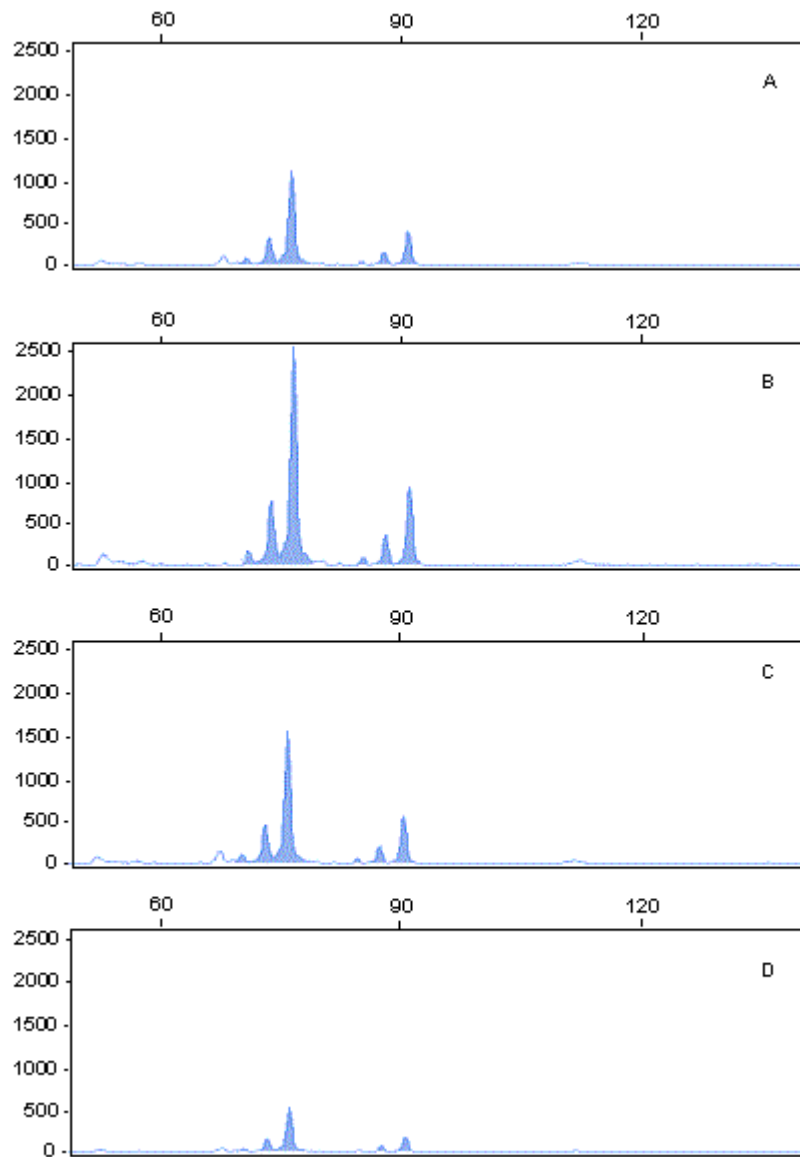


Fig. 6. Amplificación de la región CAG del gen HD. A) 1 mM MgCl₂; B) 1,5 mM MgCl₂; C) 2 mM MgCl₂; D) 3 mM MgCl₂.

RESULTADOS

3. Adición de 7-deaza-dGTP.

Establecida la concentración óptima de $MgCl_2$ en 1,5 mM, se estudió la adición de 7-deaza-dGTP. Para ello, se añadió 200 μM de cada uno de los siguientes desoxinucleótidos: dCTP, dATP, dTTP. Para una concentración final de 200 μM se mezcló en distintas proporciones dGTP y 7-deaza-dGTP. Los parámetros de amplificación fueron los anteriormente expuestos. Se observó que la proporción 1:3 (dGTP : 7-deaza-dGTP) fue la que originó mayor producto de amplificación, con una mayor diferencia en el alelo de mayor tamaño (Fig. 7).

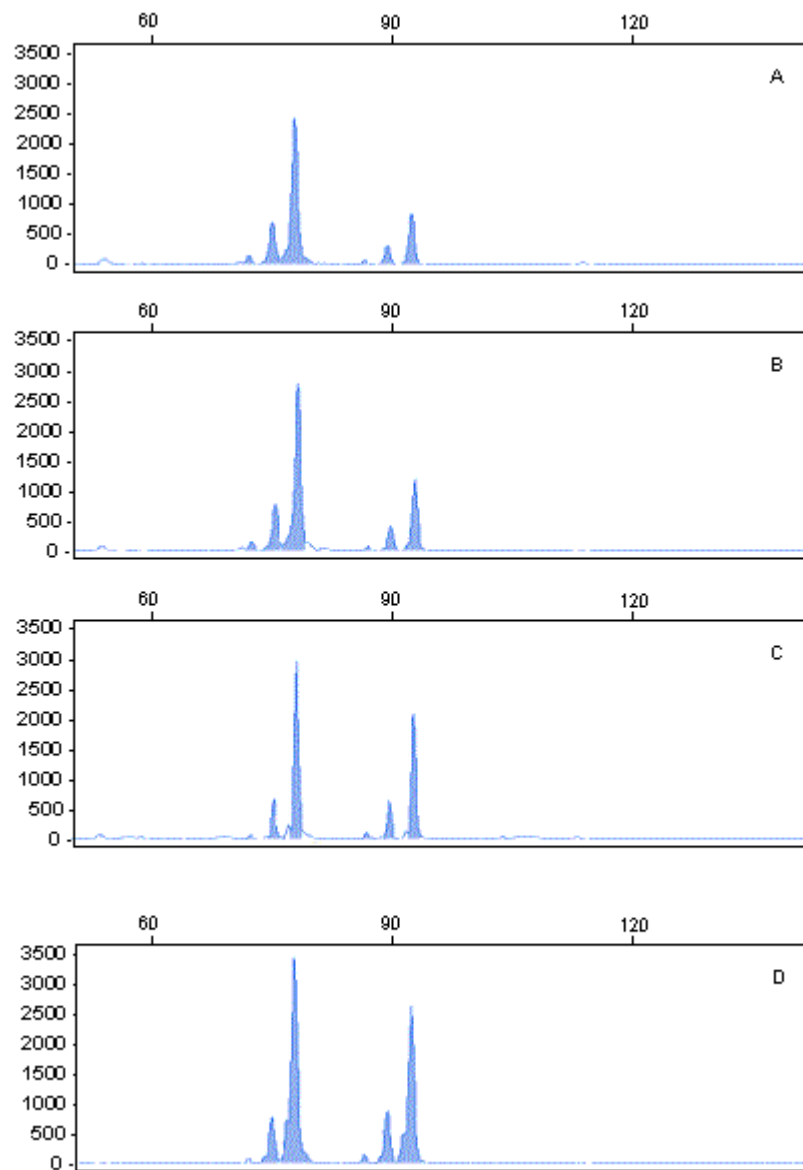


Fig. 7. Electroforegrama de la amplificación de la región CAG por PCR usando HDF1 y HDR1. La proporción de dGTP : 7-deaza-dGTP varía como sigue: A) no contiene 7-deaza-dGTP; B) 3: 1; C) 1: 1; D) 1: 3.

RESULTADOS

4. Adición de DMSO y formamida.

Una vez fijadas las condiciones de temperatura de hibridación, la concentración óptima de $MgCl_2$ (1,5 mM) y la proporción de 7-deaza-dGTP, se estudió la influencia de la adición de dimetilsulfóxido (DMSO) y formamida. Dado que el DMSO puede llegar a inhibir la Taq polimerasa se determinó la cantidad óptima para obtener buenos resultados realizándose ensayos a 6, 8 y 10%. A una concentración del 10 % no hubo amplificación y, entre 6 y 8 % los resultados fueron similares siendo un poco mejor al 6 % (Fig. 8). La formamida se estudió a una concentración de 30 mg/L. Sin embargo en este caso se produjo desdoblamiento de los picos y señal más baja que con DMSO, por lo cual no fue utilizado en experimentos posteriores (Fig. 8).

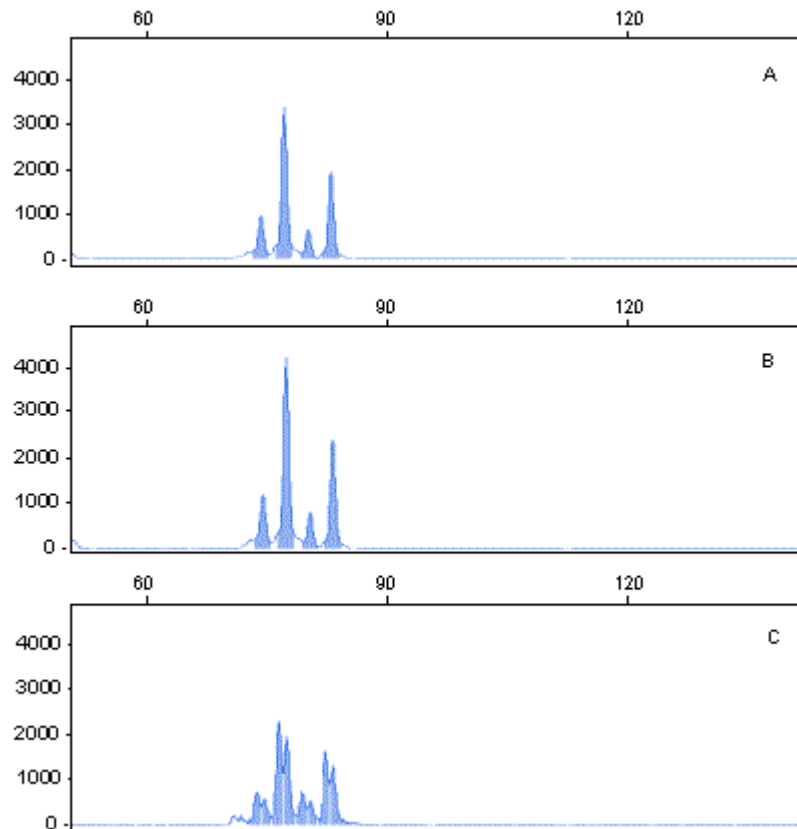


Fig. 8. Electroforegrama de la amplificación de la región CAG por PCR usando HDF1 y HDR1. Muestra el efecto de la adición de formamida (C), DMSO 6%(B) y DMSO 8% (A) a la reacción de PCR.

5. Variación de la cantidad de DNA.

Establecidas la temperatura de hibridación, la concentración óptima de $MgCl_2$ (1,5 mM), la proporción de 7-deaza-dGTP y concentración de DMSO, se llevaron a cabo amplificaciones con distintas cantidades de DNA: 10, 25 y 50 ng de DNA. Se obtuvieron los mejores resultados con 50 ng de DNA (Fig.9).

RESULTADOS

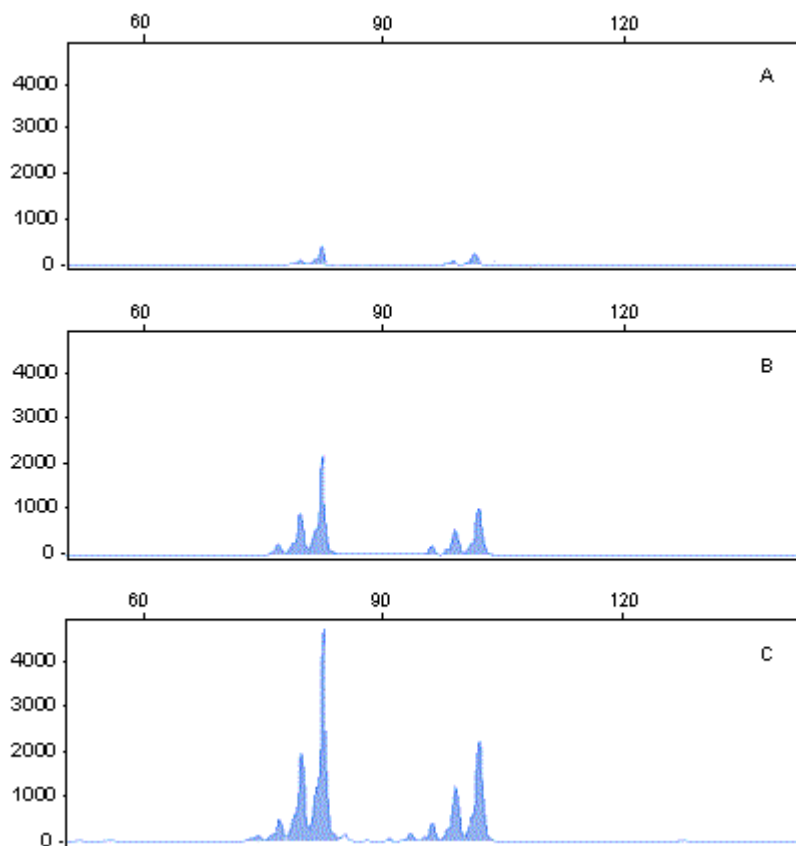


Fig. 9. Electroforegrama de la amplificación de la región CAG por PCR usando HDF1 y HDR1. Se utilizó diferentes concentraciones de DNA: A) 10 ng; B) 25 ng; C) 50 ng.

6. Variación del número de ciclos.

Una vez establecidas las concentraciones óptimas de $MgCl_2$ (1,5 mM), 7-deaza-dGTP, DMSO (6%) y DNA (50 ng), se realizaron amplificaciones a 30, 35 y 40 ciclos. Se obtuvo la señal óptima con 35 ciclos, con 40 ciclos aparecieron múltiples bandas secundarias (Fig. 10).

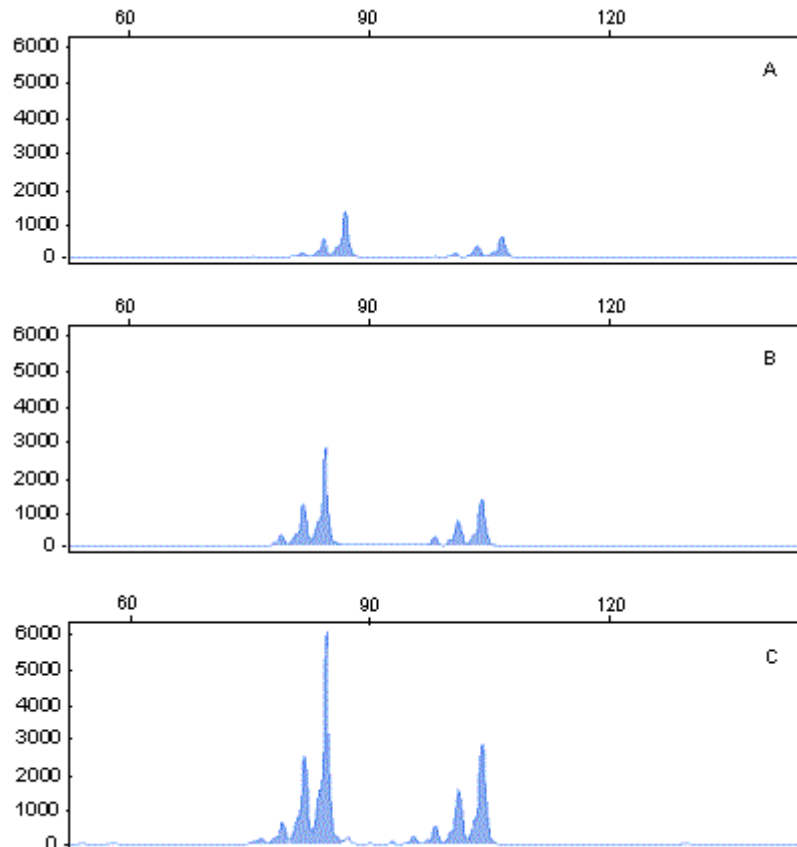


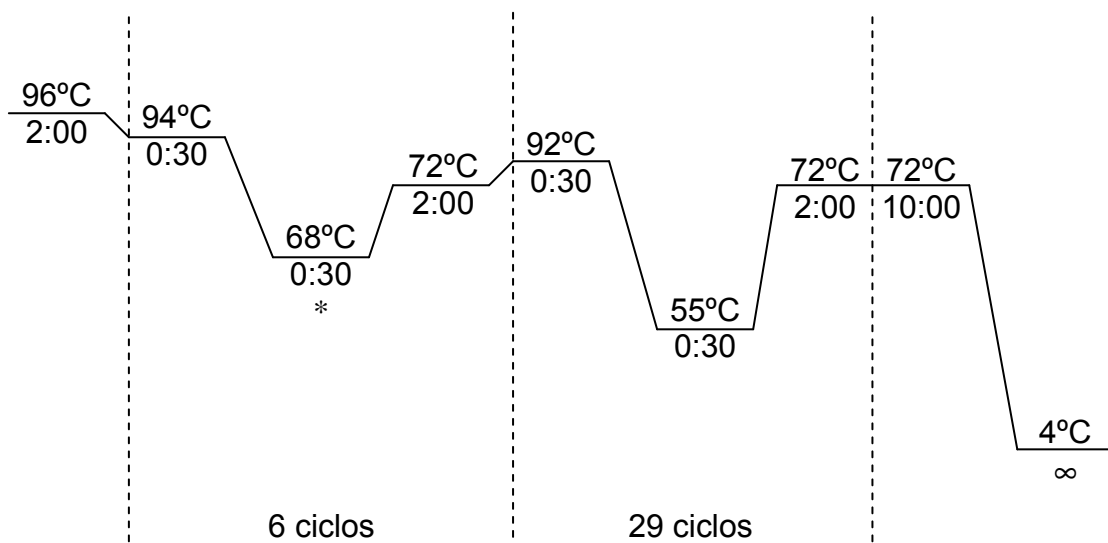
Fig. 10. Electroforegrama de la amplificación de la región CAG por PCR usando HDF1 y HDR1, a diferentes ciclos: A) 30 ciclos; B) 35 ciclos; C) 40 ciclos.

Por tanto, se establece como condiciones óptimas de amplificación las siguientes: tampón 1X para la Taq polimerasa, 200 μM de dNTP (con una proporción final de 1:3 dGTP:7-deaza-dGTP), 1,5 μM de MgCl_2 , 0,2 μM de cada

RESULTADOS

cebador, 6% de DMSO, 1,25 U Taq polimerasa, 50 ng de DNA y cantidad suficiente de agua desionizada estéril para un volumen final de 25 μ L.

Con las condiciones anteriormente expuestas se estudió la eficacia de los parámetros de amplificación siguientes:



El asterisco (*) indica la disminución de la temperatura, 2°C, en cada ciclo hasta alcanzar la temperatura de hibridación.

Este nuevo programa no cumplió con las expectativas y se mantuvo los parámetros técnicos iniciales (Fig. 11).

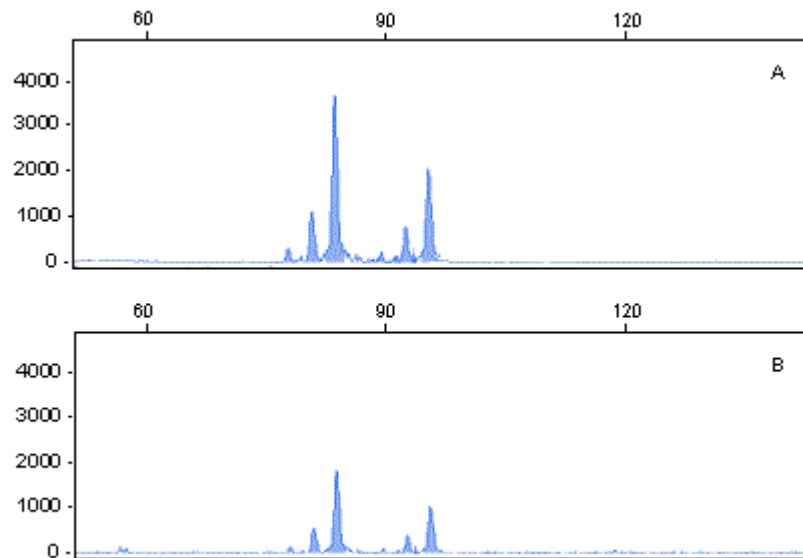


Fig. 11. Electroforegrama de la amplificación de la región CAG por PCR usando HDF1 y HDR1. Se varió el programa del termociclador A) Desnaturalización inicial a 96°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; y una extensión final a 72°C durante 10 min. B) Desnaturalización inicial a 96°C durante 2 min, seguido de 6 ciclos a 94°C durante 30 s, 68°C durante 30 s y en cada ciclo disminuye la temperatura en 2°C y 72°C durante 2 min; seguido de 29 ciclos a 92°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; y una extensión final a 72°C durante 10 min.

Para las muestras que contenían un número superior a 40 repeticiones CAG, se ajustó la cantidad de DNA a 100 ng y 40 ciclos (Fig. 12).

RESULTADOS

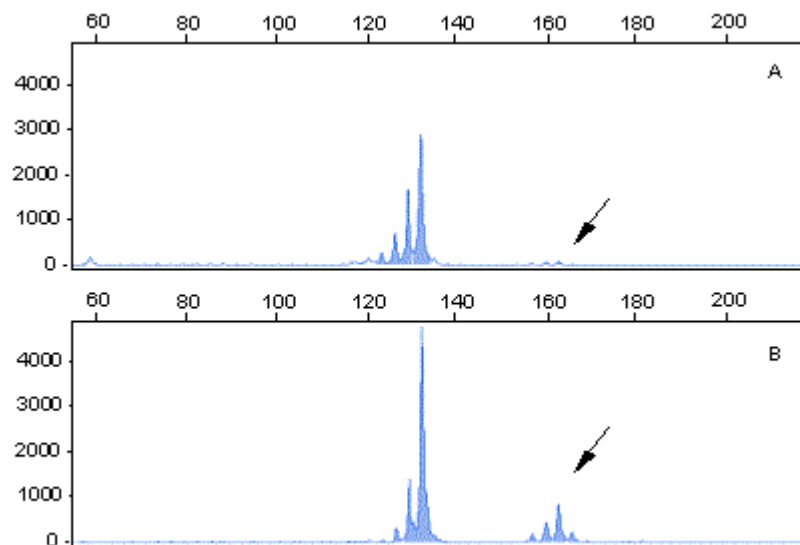


Fig. 12. Electroforegrama de la amplificación de la región CAG por PCR usando HDF1 y HDR1, que contiene más de 40 repeticiones CAG. A) 50 ng y 35 ciclos B) 100 ng y 40 ciclos.

Con estas condiciones se procedió a la amplificación de la secuencia expansiva CAG del gen HD en 155 muestras. El tamaño obtenido de la región CAG del gen HD con un alelo normal (≤ 26 tripletes de CAG) fue un fragmento de ≤ 116 nucleótidos, con un alelo normal mutable (27-35 repeticiones CAG) se obtuvo un fragmento de 119 a 143 nucleótidos, con un alelo de baja penetrancia (36-39 repeticiones CAG) se obtuvo un fragmento de 146-155 nucleótidos y con un alelo mutado (≥ 40 repeticiones) se obtuvo un fragmento ≥ 158 nucleótidos. Al amplificar la región CCG sola se detectaron fragmentos de 53 a 68 nucleótidos para los alelos de 7 a 12 repeticiones respectivamente (Fig. 13 a 16).

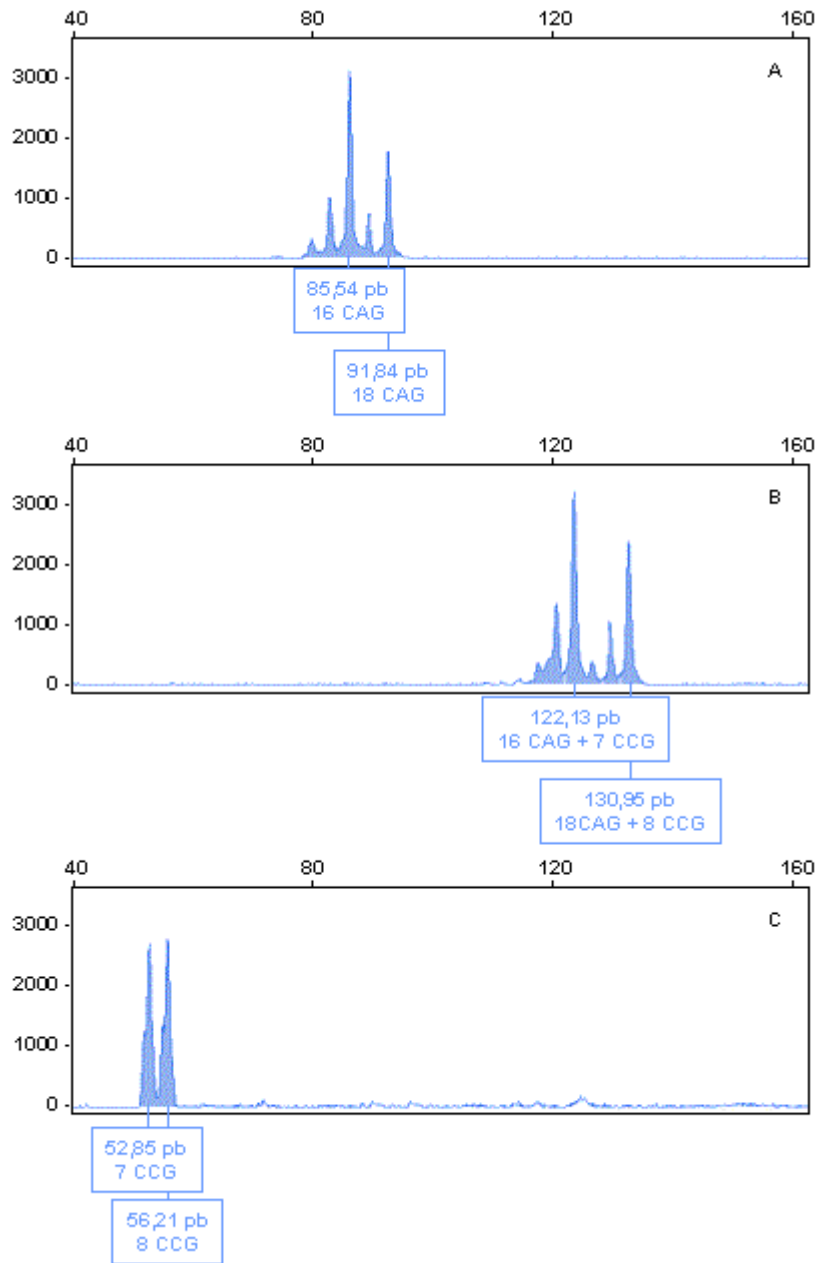


Fig. 13. Amplificación de la región CAG (A), CAG+CCG (B) y CCG (C) del gen HD en un control sano.

RESULTADOS

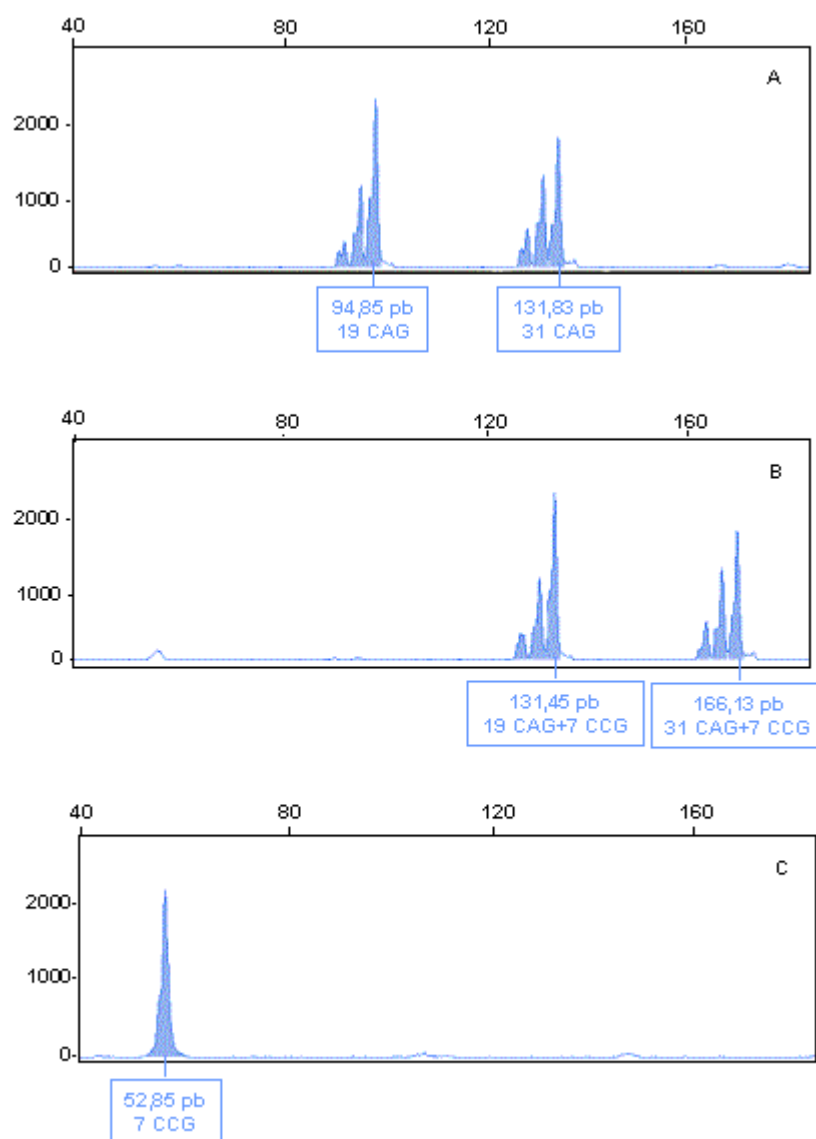


Fig. 14. Amplificación de la región CAG (A), CAG+CCG (B) y CCG (C) del gen HD con un alelo en el rango de mutabilidad.

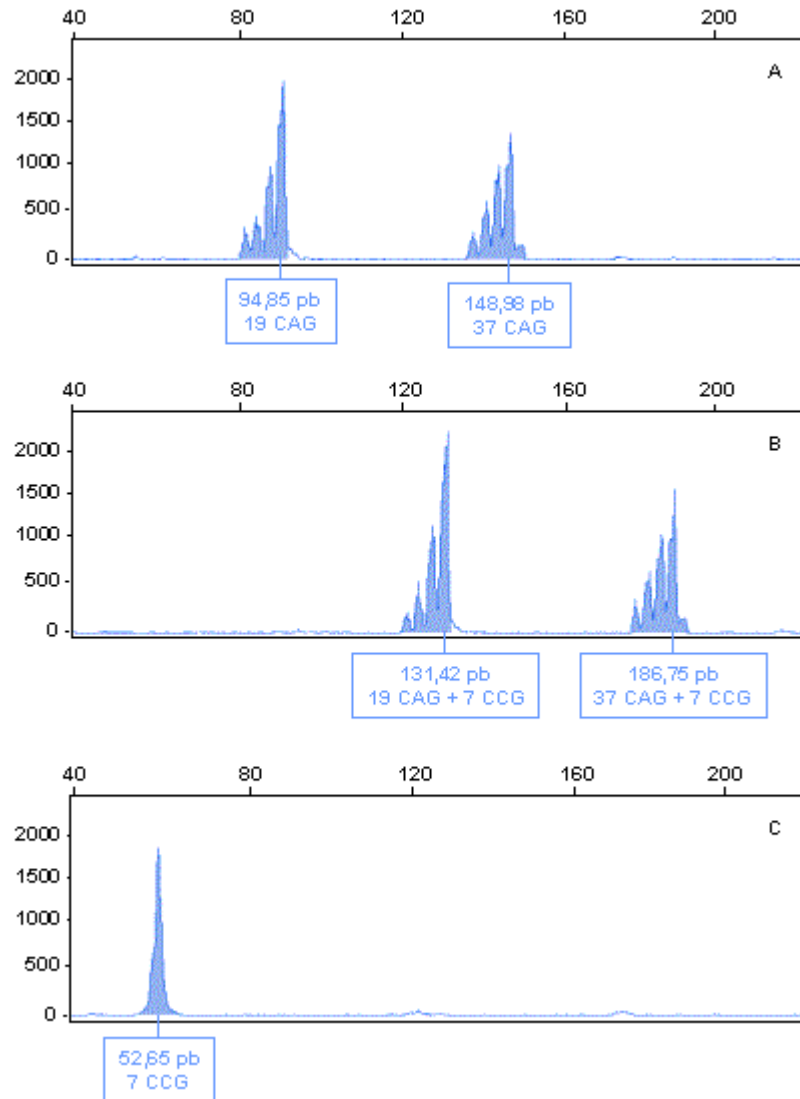


Fig. 15. Amplificación de la región CAG (A), CAG+CCG (B) y CCG (C) del gen HD en un paciente con un alelo en el rango de baja penetrancia.

RESULTADOS

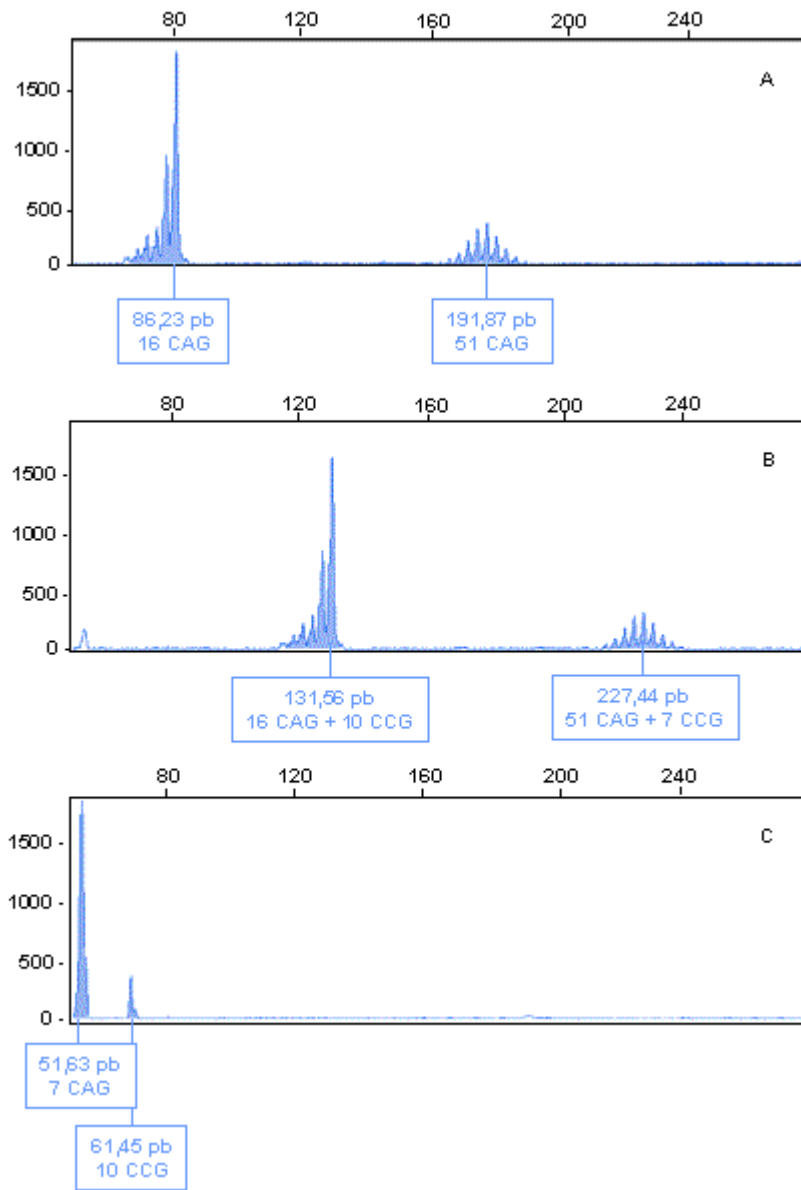


Fig. 16. Amplificación de la región CAG (A), CAG+CCG (B) y CCG (C) del gen HD en un paciente con un alelo en el rango de total penetrancia.

4.2. SECUENCIACIÓN

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos y la exactitud del método,

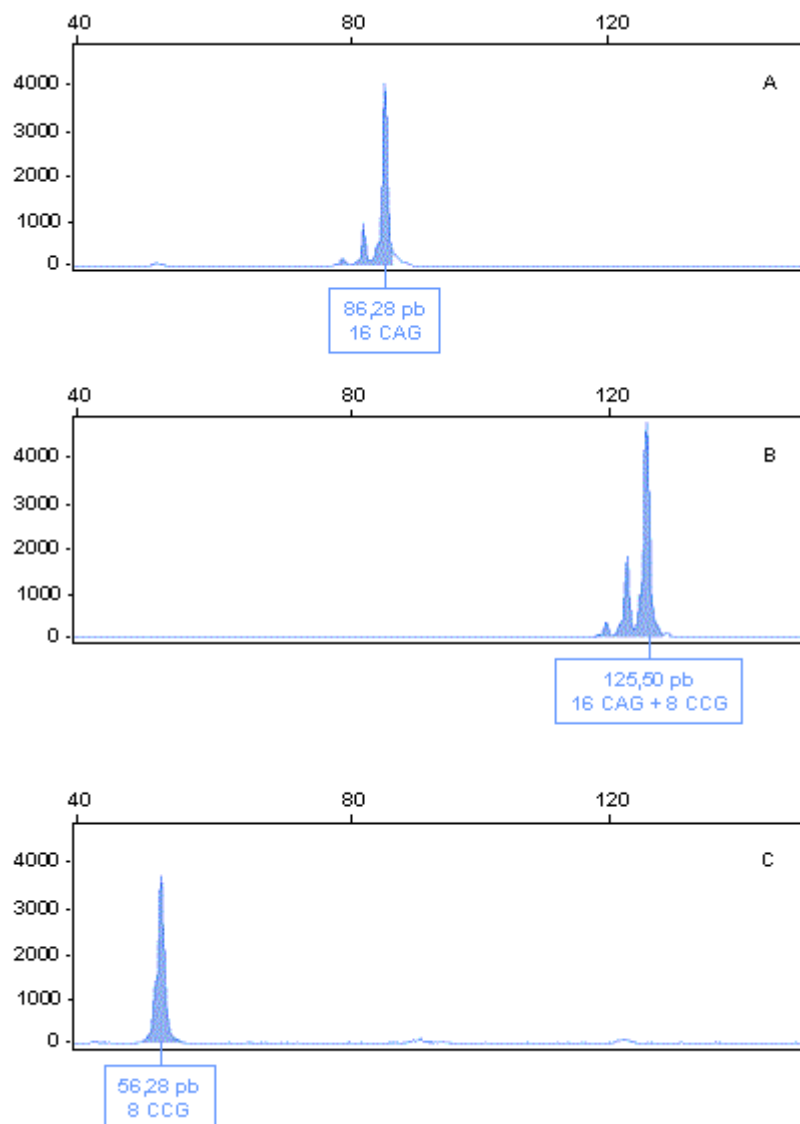


Fig. 17. Amplificación de la región CAG (A), CAG + CCG (B) y CCG (C) de un individuo homocigoto tanto para las repeticiones CAG como para los tripletes CCG.

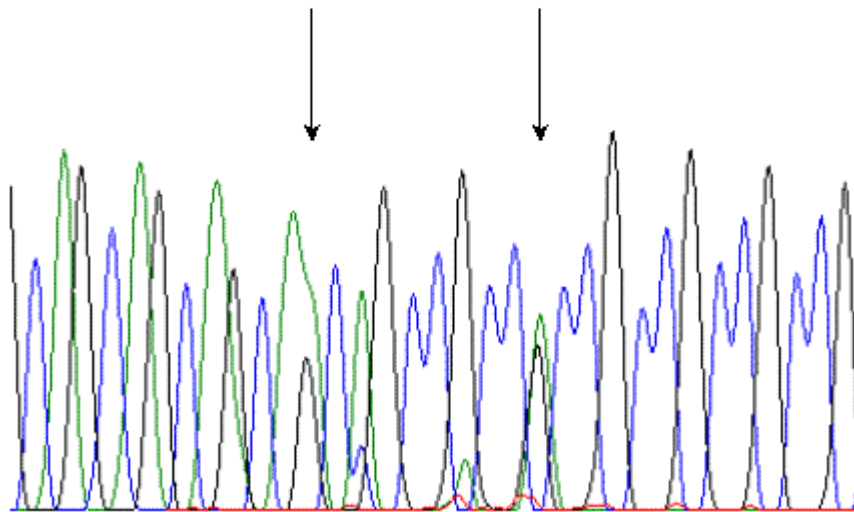
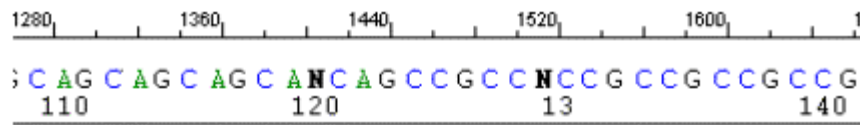


Fig. 19. Secuencia de la zona de intersección entre la región CAG y la CCG que presenta dos polimorfismos de sustitución de una A por G, señalados con flechas.

4.3. PACIENTES

Se procedió a la amplificación de la zona repetitiva CAG en 200 cromosomas procedentes de individuos normales. Las repeticiones del triplete CAG comprendidas entre 14 y 19 se obtuvieron en 149 de los 200 cromosomas estudiados, lo que representa un 74,5% del total. Un 19% de los estudiados

RESULTADOS

mostraron un rango entre 20 y 26 repeticiones del triplete CAG. Con una menor frecuencia (6%), se detectaron repeticiones del triplete CAG con un número inferior a 13. Solo, en un caso, que representan el 0,5% del total de los cromosomas estudiados se encontraron repeticiones del triplete CAG en el rango de 27 a 35 (Tabla 4). Es de destacar que el 87% de los individuos estudiados fueron heterocigotos para la zona CAG.

Rango del número de repeticiones CAG	Número de cromosomas	Frecuencia (%)
≤ 13	12	6
14-19	149	74,5
20-26	38	19
27-35	1	0,5
TOTAL	200	100

Tabla 4. Número de repeticiones CAG en cromosomas normales.

De acuerdo con lo descrito en material y métodos, cuando al fragmento amplificado que incluye la secuencia repetitiva CAG y la zona polimórfica CCG se le sustrae el fragmento amplificado donde sólo se incluye la secuencia repetitiva CAG, se obtiene exactamente el tamaño de la zona repetitiva CCG y cuyos resultados se recogen en la tabla 5. Estos resultados fueron corroborados con la

RESULTADOS

amplificación exclusiva de los tripletes CCG. Se pudo observar que esta zona es efectivamente polimórfica, habiéndose detectado seis haplotipos diferentes con número de repeticiones de dicho triplete de 7, 8, 9, 10, 11 y 12. El haplotipo más frecuente correspondió al de 7 repeticiones del triplete CCG, ya que se obtuvo en 95 de los 200 cromosomas estudiados, lo que representó una frecuencia del 47,5%, seguido en orden decreciente de frecuencia por el número de repeticiones CCG de 10 (30,5%), 9 (10,5%), 8 (8%), 11 (2,5%) y 12 (1%) (Tabla 5).

Número de repeticiones CCG	Número de cromosomas	Frecuencia (%)
7	95	47,5
8	16	8
9	21	10,5
10	61	30,5
11	5	2,5
12	2	1
TOTAL	200	100

Tabla 5. Número de repeticiones CCG en cromosomas normales.

De las 36 muestras con sospecha de EH remitidas a nuestro centro, se confirmó la enfermedad en 22 de ellas, cuyos alelos expandidos tenían un número de repeticiones CAG comprendidas entre 39 y 51. Los alelos normales poseían

RESULTADOS

una extensión de 9 a 27 repeticiones de CAG. Se encontraron dos muestras con expansiones comprendidas en el rango de baja penetrancia de 36 y 37 repeticiones respectivamente; y tres pertenecientes a alelo normal mutable con 27 y 30 repeticiones. Del resto de pacientes se pudo descartar la EH como causante de los síntomas y realizar un diagnóstico alternativo. El test predictivo realizado a 19 pacientes detectó 3 individuos con un número de repeticiones mayor a 40, 5 con 39 repeticiones, 2 individuos con 27 y 30 repeticiones y 9 con menos de 26 repeticiones. En los pacientes con un rango comprendido entre 27 y 35 repeticiones se aconsejó el estudio molecular a la descendencia. Se detectó claramente un caso de homocigosis de la región CAG gracias a la amplificación con los cebadores HDF1 y HDR2 (Fig. 20).

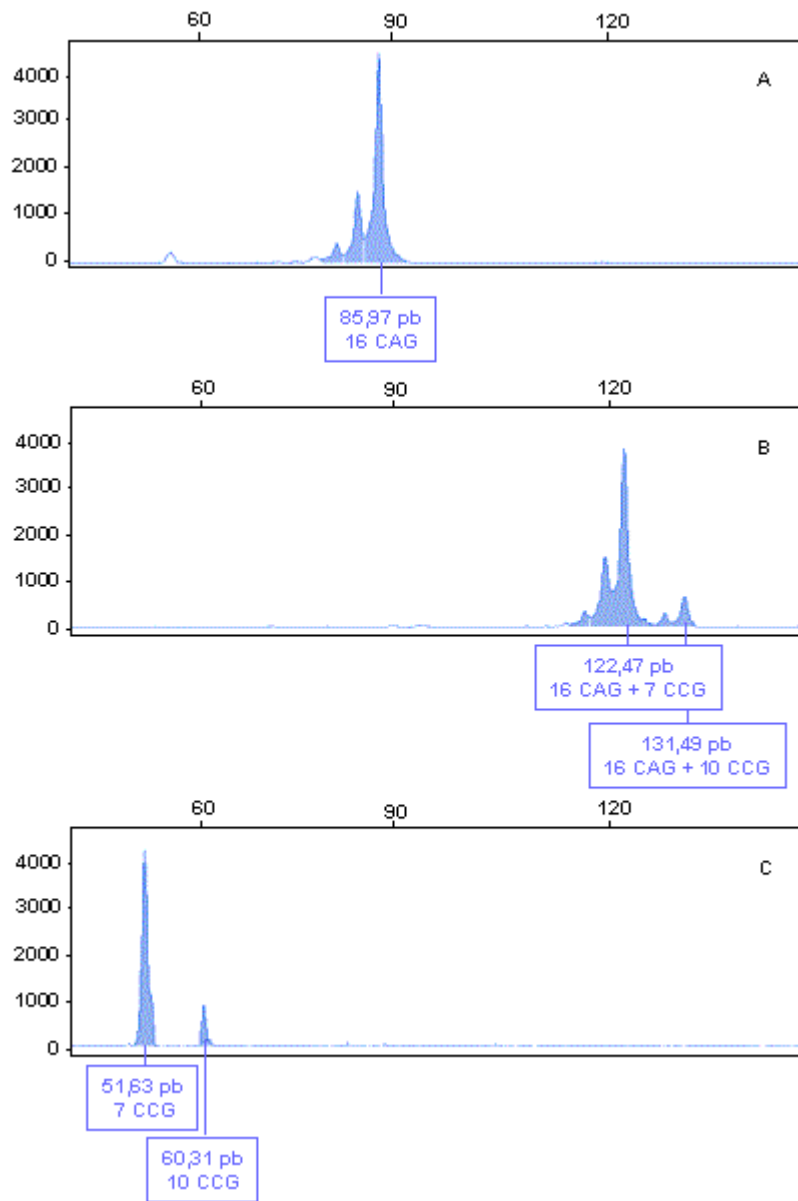


Fig. 20. Amplificación de la región CAG (A), CAG+CCG (B) y CCG (C) del gen HD en un individuo sano homocigoto para las repeticiones CAG.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Antes del descubrimiento del gen HD y la mutación responsable de la EH, el diagnóstico se basaba en los rasgos clínicos, la historia familiar, y la confirmación patológica. Tras la localización del defecto genético responsable de la EH en el cromosoma 4 (Gusella *et al.*, 1983), se pudo realizar un diagnóstico presintomático y prenatal mediante análisis de ligamiento usando marcadores genéticos (Meissen *et al.*, 1988). Tuvieron que transcurrir 10 años para encontrar el gen HD (HDCRG, 1993) y el defecto genético causante de la EH, que consiste en una expansión trinucleotídica de repeticiones CAG, cuyo tamaño es responsable directo del fenotipo. Inicialmente, la determinación del número de repeticiones CAG se calculó a partir de la longitud del producto de PCR obtenido de amplificar la región CAG junto a la CCG y CCT, asumiendo que la zona CCG contenía 7 tripletes y la CCT dos tripletes (HDCRG, 1993). Los cebadores utilizados en este caso son HD1 y HD2 (Fig. 21). Posteriormente, se demostró que la región CCG era polimórfica, variaba entre 7 y 12 tripletes (Rubinsztein *et al.*, 1993; Andrew *et al.*, 1994), y la CCT poseía 2 tripletes (común) o 3 tripletes (raro) de longitud (Pecheux *et al.*, 1995). Para evitar una sobrestimación en el cómputo de las repeticiones CAG, se recomendó a los laboratorios usar un ensayo de PCR que sólo amplificara la región CAG (Andrew *et al.*, 1994;

DISCUSIÓN

ACMG/ASHG, 1998) y para ello se diseñaron un nuevo par de cebadores (Warner *et al.*, 1993) HD1 y HD3 (Fig. 21).

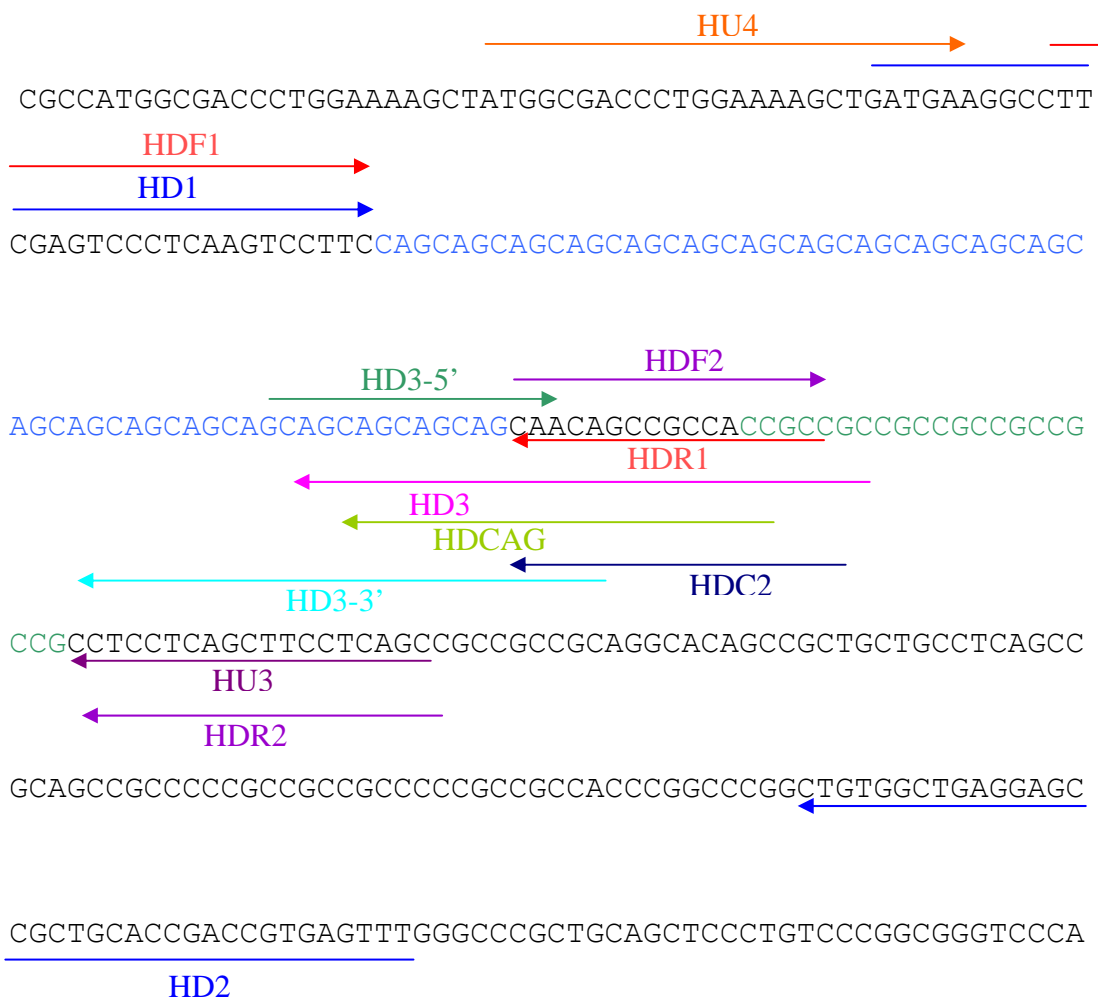


Fig. 21. Región del gen HD que muestra los diferentes cebadores utilizados en la amplificación de las repeticiones CAG (en azul) y región adyacente polimórfica CCG (en verde).

La mayoría de los protocolos de PCR descritos incluyen aditivos químicos que aumentan la resolución como el dimetilsulfóxido (DMSO), formamida o glicerol, y sustitución parcial o completa de dGTP por 7-deaza-dGTP (Andrew *et al.*, 1993; Duyao *et al.*, 1993; Snell *et al.*, 1993). La Taq polimerasa incorpora esta base análoga en las secuencias amplificadas con cinética similar a la empleada con dGTP. Se ha observado que esta sustitución facilita la amplificación de secuencias ricas en citosinas y guaninas. Tales secuencias, al igual que en el gen HD, son difíciles o imposibles de amplificar por métodos convencionales (Innis *et al.*, 1988), debido a que forman estructuras secundarias o terciarias muy fuertes mediante enlaces de hidrógeno Hoogsteen, de tal forma que la unión del cebador a la secuencia patrón es ineficiente, y la extensión por la Taq polimerasa incompleta. Para evitarlo se sustituyó de forma parcial o completa el dGTP por 7-deaza-dGTP, el cual impide la formación de los enlaces Hoogsteen y consecuentemente desestabiliza las estructuras secundarias, gracias a que se reemplaza el nitrógeno 7 del anillo de guanina por un carbono (Barr *et al.*, 1986; Innis *et al.*, 1988). Sin embargo, el 7-deaza-dGTP provoca dos problemas en los análisis de los productos de PCR. Primero, los fragmentos de DNA que contienen 7-deaza-dGTP migran más lentamente que el DNA sin modificar. De esta forma, el número de repeticiones se puede sobreestimar excepto si se utilizan marcadores especiales o geles en condiciones desnaturizantes. En segundo lugar, los fragmentos amplificados que contienen 7-deaza-dGTP son difíciles de visualizar al teñirlos con bromuro de etidio, presumiblemente porque la presencia

DISCUSIÓN

del 7-deaza-dGTP altera la estructura electrónica del bromuro de etidio impidiendo la fluorescencia (Latimer & Lee, 1991; Seela & Röling, 1992).

Aunque se han publicado métodos en los cuales los productos de PCR se tiñen con bromuro de etidio (Valdes *et al.*, 1993; Warner *et al.*, 1993), la mayoría de los procedimientos publicados necesitan análisis radiactivo para estimar la longitud de la repetición trinucleotídica. Los fragmentos se amplifican por PCR, usando cebadores marcados con radiactividad, y se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida y se visualizan por autorradiografía (Goldberg *et al.*, 1993; HDCRG, 1993; Riess *et al.*, 1993). Se ha publicado un ensayo de PCR basado en la detección quimioluminiscente, donde los alelos amplificados se separan en gel de poliacrilamida, se transfieren por Southern y se detectan por hibridación con cebadores específicos marcados con fluoresceína-dUTP (Castellvi-Bel *et al.*, 1994). Alternativamente, los fragmentos pueden ser detectados tiñéndolos con nitrato de plata (Muglia *et al.*, 1996; Tóth *et al.*, 1997c; Tóth *et al.*, 1997b) o por detección fluorescente utilizando electroforesis capilar en un analizador genético ABI 310 (Applied Biosystems) (Tóth *et al.*, 1997a). La amplificación de los alelos con tamaño superior a 60 repeticiones de CAG es muy difícil y se necesita emplear métodos de transferencia Southern para obtener resultados claros (Guida *et al.*, 1996).

La detección de un solo alelo puede causar un diagnóstico confuso. Normalmente los resultados reflejan homocigosis. Para confirmarlo es necesario realizar el ensayo original que amplifica la región CAG junto con la CCG (ACMG/ASHG, 1998). De esta forma se obtienen dos productos de PCR de tamaño diferente si las repeticiones CCG se encuentran en heterocigosis. Si fuera necesario, el tamaño de la región CAG se confirmaría con una segunda amplificación de la región CCG sólo (Andrew *et al.*, 1994; Gellera *et al.*, 1996).

La detección de un solo alelo puede deberse también al fracaso de la reacción de PCR por tratarse de una expansión trinucleotídica muy larga. Esto se podrá sospechar en los casos de Huntington juvenil. En este caso un análisis por Southern confirmaría la expansión, pero la longitud exacta sería muy difícil de determinar. La amplificación de la región CAG también puede fallar por la presencia de polimorfismos que impiden la hibridación correcta de uno de los cebadores. Se han detectado cinco polimorfismos (Fig. 22) hasta la fecha (Gellera *et al.*, 1996; Margolis *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000), y es posible que existan otros. La frecuencia de estos polimorfismos es de ~1% (Yu *et al.*, 2000).

DISCUSIÓN

Normal:	TTC (CAG) _n CAG CAG CAA CAG CCG CCA (CCG) _n
Gellera <i>et al.</i>	TTC (CAG) _n CAG CAG CAG CAG CCG CCA (CCG) _n
Margolis <i>et al.</i>	TTG (CAG) _n CAG CAG CAA CAG CCG CCA (CCG) _n
Margolis <i>et al.</i>	TTC (CAG) _n CAG CAG CAA CAG CCG CCG (CCG) _n
Yu <i>et al.</i>	TTC (CAG) _n CAA CAG CAA CAG CCG CCA (CCG) _n
Yu <i>et al.</i>	TTC (CAG) _n CAG CAA CAA CAG CCG CCA (CCG) _n

Fig. 22. Polimorfismos en la región expansiva del gen HD marcados en negrita y subrayados.

Yu *et al.* amplifican la región CAG utilizando sólo los cebadores HD1 (Snell *et al.*, 1993) cuya base 29 del extremo 5' (T) ha sido reemplazada por una C y el cebador HDCAG (Bond & Hodes, 1994) donde se introduce otro cambio en la segunda base del extremo 5', una G reemplaza a una C. Para aquellos casos en los que se amplifique un único alelo, hacen una nueva amplificación que contiene la región CAG y CCG utilizando los cebadores HU3 y HU4 (Riess *et al.*, 1993). Debido al polimorfismo encontrado sustituyeron el cebador HDCAG por HDC2 que eludía la zona polimórfica mencionada (Fig. 21).

Margolis *et al.* amplifican la región CAG empleando como cebadores HD1-corto y HD3-3'. HD1-corto se diferencia de HD1 en que no posee las tres bases primeras del extremo 3' para evitar una mala hibridación del cebador en los casos de un polimorfismo C→G de la base que precede a las repeticiones CAG.

La región CCG/CCT la amplifican usando HD3-5' y HD2'. La región CAG + CCG la amplifican usando HD1-corto y HD2' ó HU4 y HU3 (Fig. 21).

En este trabajo de investigación, hemos desarrollado un método que determina el número exacto de repeticiones CAG, de tal forma que permite un diagnóstico certero de la enfermedad de Huntington. Este método es rápido, sencillo y seguro, a diferencia de los métodos convencionales que emplean análisis radiactivo y geles de poliacrilamida. Nosotros empleamos detección fluorescente y electroforesis capilar.

El diseño de los cebadores fue primordial para minimizar el número de bandas secundarias. Con este fin, en el cebador HDR1 (Fig. 23) se introdujo un cambio (T→C) en la base 16 del extremo 5' y en el cebador HDF2 (Fig. 24) otro cambio (C→A) en la base 16 del extremo 5'. Estos cambios no impiden la hibridación correcta del cebador con la secuencia complementaria y la amplificación correspondiente. Sin embargo, evita la hibridación del oligonucleótido si se desplaza tanto a la izquierda como a la derecha, debido a la acumulación de bases desapareadas, marcadas con una X (Fig. 23 y 24).

DISCUSIÓN



Fig. 23. La secuencia en azul corresponde a la región del gen HD donde hibrida el cebador HDR1; las otras tres secuencias en rojo corresponde al cebador HDR1, siendo la primera de éstas la posición correcta de hibridación y la base en negrita el cambio efectuado, y las dos últimas son distintas posiciones de hibridación de este cebador.



Fig. 24. La secuencia en azul corresponde a la región del gen HD donde hibrida el cebador HDF2; las otras tres secuencias en violeta corresponde al cebador HDF2, siendo la tercera de éstas la posición correcta de hibridación y la base en negrita el cambio efectuado, y las dos primeras son distintas posiciones de hibridación de este cebador.

Para la cuantificación exacta de las repeticiones CAG la amplificación se llevó a cabo en tres reacciones independientes donde se obtuvieron el tamaño de la región CAG sola, la región CAG junto a la CCG y la región CCG sola. Las tres confirmaron el mismo número de repeticiones CAG (Fig. 17). No obstante, se realizó una segunda comprobación mediante la secuenciación de esta región, en la que se obtuvo una diferencia de tan solo +1 triplete (Fig. 18). La exactitud de

nuestro método viene, también, asegurada por la inclusión de un marcador de peso molecular, y es capaz de diferenciar alelos con un solo triplete de diferencia.

Hemos encontrado un individuo con un alelo con una secuencia pura de repeticiones CAG y CCG, debido a que posee dos polimorfismos: el primero es una sustitución A→G en la tercera base inmediatamente siguiente al tracto CAG y el segundo es otra sustitución A→G de la base que precede al tracto CCG (Fig. 19). Estos polimorfismos no han impedido la hibridación correcta de los cebadores y su correspondiente amplificación.

Hemos observado como la adición de determinados reactivos y las condiciones de la reacción de PCR han sido fundamentales para obtener un alto rendimiento del producto amplificado, sobre todo aumentando la cantidad de producto del alelo de mayor tamaño. Así como, obtener una mayor resolución de las expansiones más largas. En concreto, el ajuste de las concentraciones de DMSO y 7-deaza-dGTP permitió disminuir el número de productos inespecíficos que pudieran interferir con la interpretación de los resultados. De esta forma, es fácil determinar el tamaño de la región CAG y el número exacto de repeticiones. La exactitud de nuestro método en la determinación de la expansión CAG se pone claramente de manifiesto cuando dicha muestra fue secuenciada. Así solamente existe una diferencia de +1 triplete entre el resultado obtenido mediante amplificación por PCR y secuenciación.

DISCUSIÓN

Con este método hemos conseguido disminuir las limitaciones del diagnóstico de la enfermedad de Huntington mediante PCR: la amplificación de los alelos normales es mucho más eficiente que la de los alelos expandidos y los polimorfismos en la región de hibridación de los cebadores que impiden la amplificación del alelo que los posee. Hemos realizado tres amplificaciones abarcando diferentes zonas de la región donde se encuentra la mutación responsable de la EH con el fin de minimizar los casos de falsa homocigosis y asegurar la exactitud en el número de repeticiones. En cada ensayo hemos incluido un control positivo con número conocido de repeticiones CAG y un control negativo. Esta exactitud es muy importante en el rango de baja penetrancia comprendida entre 36 y 39 repeticiones CAG.

Nuestro análisis de 200 cromosomas de sujetos clínicamente normales mostró un rango de 11 a 30 repeticiones CAG, similar a otros estudios (Sánchez *et al.*, 1996; Raskin *et al.*, 2000; Kremer *et al.*, 1994). El alelo con 16 repeticiones fue el más común.

Gracias a este método ha sido posible confirmar la expansión del triplete CAG en 22 pacientes con sospecha de EH. Además, el test presintomático permitió descartar la enfermedad en 11 pacientes de los 19 estudiados.

Por último añadir, que el método desarrollado por nosotros permite realizar un diagnóstico prenatal de la EH. Así mismo las mejoras introducidas en la amplificación por PCR de nuestro método, puede servir para desarrollar métodos de diagnóstico de otras 6 enfermedades neurodegenerativas hereditarias como son la ataxia espinocerebelosa tipo 1, la ataxia espinocerebelosa tipo 2, la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (enfermedad de Machado-Joseph), la ataxia espinocerebelosa tipo 6, la atrofia dentadorrubropalidoluisiana (enfermedad de Smith) y la atrofia muscular bulbospinal (enfermedad de Kennedy), cuya mutación responsable de la enfermedad es también la expansión del triplete CAG.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El método de amplificación por PCR desarrollado en este trabajo permite la determinación exacta del número de repeticiones CAG del gen HD, gracias a la combinación de una serie de factores favorables tales como: diseño original de cebadores, condiciones de amplificación del DNA y análisis del producto amplificado por electroforesis capilar y detección fluorescente.

2. La secuenciación de la región CAG del gen HD confirma la exactitud del método de amplificación por PCR en la determinación del número exacto de tripletes CAG responsables de la enfermedad de Huntington.

3. El análisis molecular realizado en 200 cromosomas de individuos sanos revela que el porcentaje de los alelos estudiados en relación al número de repeticiones CAG es de: 74,5% en el rango de 14 a 19, 19% en el de 20 a 26, 6% menores o iguales a 13 y de un 0,5% en el de 27 a 35.

4. La aplicación de este método ha permitido el diagnóstico de 36 pacientes con sospecha de enfermedad de Huntington, donde se confirmó la enfermedad en 22 de ellos, cuyos alelos expandidos tenían un número de repeticiones CAG

CONCLUSIONES

comprendidos entre 39 y 51. El test predictivo permitió descartar la enfermedad en 11 pacientes de los 19 estudiados.

5. La amplificación de la región CAG junto con la CCG mediante la utilización de los cebadores HDF1 y HDR2 permitió la detección de un caso de homocigosis de la región CAG.

BIBLIOGRAFÍA

ACMG/ASHG statement. Laboratory guidelines for Huntington's disease genetic testing. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington's Disease Genetic Testing Working Group. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 1243-1247.

Adams P, Falek A, Arnold J. Huntington's disease in Georgia: Age at onset. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 695.

Afifi AK. Basal ganglia: functional anatomy and physiology. Part 2. *J. Child Neurol* 1994; **9**: 352-361.

Allitto BA, MacDonald ME, Bucan M, Richards J, Romano D, Whaley WL, et al. Increased recombination adjacent to the Huntington's disease-linked D4S10 marker. *Genomics* 1991; **9**: 104-112.

Altherr MR, Plummer S, Bates G, MacDonald M, Taylor S, Lehrach TH, et al. Radiation hybrid map spanning the Huntington's disease gene region of chromosome 4. *Genomics* 1992; **13**: 1040-1046.

Ambrose C, James M, Barnes G, Lin C, Bates G, Altherr MR, Duyao M, Groot N, et al. A novel G protein-coupled receptor kinase cloned from 4p.16.3. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 697-703.

BIBLIOGRAFÍA

Ambrose CM, Duyao M, Barnes G, et al. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 1994; **20**: 27-28.

Andrade MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 1995; **11**: 115-116.

Andrew SE, Goldberg YP, Hayden MR, et al. Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 2005-2010.

Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; **4**: 398-403.

Andrew SE, Goldberg YP, Theilmann J, Zeisler J, Hayden MR. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington's disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 65-67.

Arenas J, Campos Y, Ribacoba R, Martín MA, Rubio JC, Ablanedo P, et al. Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* 1998; **43**: 397-400.

Avila-Giron R. Medical and social aspects of Huntington's chorea in the State of Zulia, Venezuela, in Barbeau A, Chase TN, Paulson GW (eds). *Advances in Neurology*. New York, Raven, 1973, vol 1, p 261.

Aylward EH, Li Q, Stine OC, et al. Longitudinal change in basal ganglia volume in patients with Huntington's disease. *Neurology* 1997; **48**: 394-399.

Baldessarini RJ. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9 ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 431-459.

Banerjee SP, Zuck LG, Yablonsky-Alter E, Lidsky TI. Glutamate agonist activity: implications for antipsychotic drug action and schizophrenia. *Neuroreport* 1995; **6**: 2500-2504.

Bao J, Sharp AH, Wagster MV, Becher M, Schilling G, Ross CA, et al. Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5037-5042.

Barr PJ, Thayer RM, Laybourn P, Najarian RC, Sella F, Tolan DR. 7-Deaza-2'deoxyguanosine-5'triphosphate: enhanced resolution in M13 dideoxy sequencing. *Bio Techniques* 1986; **4**: 428-432.

BIBLIOGRAFÍA

Bates GP, MacDonald ME, Baxendale S, Sedlacek Z, Youngman S, Romano D, Whaley WL, et al. A YAC telomere clone spanning a possible location of the Huntington's disease gene. *Am J Hum Genet* 1990; **46**: 762-775.

Bates GP, MacDonald ME, Baxendale S, Youngman S, Lin C, Whaley WL, Wasmuth JJ, et al. Defined physical limits of the Huntington disease gene candidate region. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 7-16.

Bates GP, Valdes J, Hummerich H, Baxendale S, Le Palier DL, Monaco AP, et al. Characterization of a yeast artificial chromosome contig spanning the Huntington's disease gene candidate region. *Nature Genet* 1992; **1**: 180-187.

Becher MW, Kotzuk JA, Sharp AH, Davies SW, Bates GP, Price DL, et al. Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol Dis* 1998; **4**: 387-397.

Beenen N, Büttner U, Lange HW. The diagnostic value of eye movement recordings in patients with Huntington's disease and their offspring. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1986; **63**:109.

Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome suystem by protein aggregation. *Science* 2001; **292**: 1552-1555.

Benjamin CM, Adam S, Wiggins S, Theilmann JL, Copley TT, Bloch M, Squitieri F et al. Proceed with care: direct predictive testing for Huntington's disease. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: 606-617.

Berardelli A, Noth J, Thompson PD, Bollen EL, Curra A, Deuschl G, et al. Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Mov Disord* 1999; **14**: 398-403.

Bhide PG, Day M, Sapp E, Schwarz C, Sheth A, Kim J, et al. Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *J Neurosci* 1996; **16**: 5523-5535.

Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Zinder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, et al. Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6809-6814.

Bird ED, Caro AJ, Pilling JB. A sex related factor in the inheritance of Huntington's chorea. *Ann Hum Genet* 1974; **37**: 255.

Block-Galarza J, Chase KO, Sapp E, Vaughn KT, Vallee RB, DiFiglia M, et al. Fast transport and retrograde movement of huntingtin and HAP1 in axons. *Neuroreport* 1997; **8**: 2247-2251.

Boado RJ, et al. Antisense-mediated down-regulation of the human huntingtin gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **295**: 239-243.

BIBLIOGRAFÍA

Boehnke M, Conneally PM, Lange K. Two models for a maternal factor in the inheritance of Huntington's disease. *Am J Hum Genet* 1983; **35**: 845.

Bond CE, Hodes ME. New primer for specific amplification of the CAG repeat in Huntington disease alleles. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: suppl A356.

Boutell JM, Thomas P, Neal JW, Weston VJ, Duce J, Harper PS, et al. Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 1647-1655.

Boutell JM, Wood JD, Harper PS, Jones AL. Huntingtin interacts with cystathionine beta-synthase. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 371-378.

Brandt J, Butters N. The neuropsychology of Huntington's disease. *Trends Neurosci* 1986; **9**: 118.

Brandt J, Folstein SE, Folstein MF. Differential cognitive impairment in Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Ann Neurol* 1988; **23**: 555.

Brothers CRD. Huntington's chorea in Victoria and Tasmania. *J Neurol Sci* 1964; **1**: 405.

Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 1997; **41**: 646-653.

Bruyn GW. Huntington's chorea. Historical, clinical and laboratory synopsis, in Vinken PJ, Bruyn GW (eds): Diseases of the basal ganglia. *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam, North Holland, 1968, vol **6**, p 298.

Bucan M, Zimmer M, Whaley WL, Poutska A, Youngman S, Allitto BA, et al. Physical maps of 4p16.3, the area expected to contain the Huntington's disease mutation. *Genomics* 1990; **6**: 1-15.

Buckler AJ, Chang DD, Graw SL, Brook JD, Haber DA, Sharp PA, Housman DE. Exon amplification: A strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4005-4009.

Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, et al. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 1996; **2**: 347-350.

Burson CM, Markey KR. Genetic counseling issues in predictive genetic testing for familial adult-onset neurologic diseases. *Semin Pediatr Neurol* 2001; **8**: 177-186.

Caine ED, Fisher JM. Dementia in Huntington's disease, in Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL, Frederiks JAM (eds): *Handbook of Clinical Neurology*, vol **46**, rev series 2, *Neurobehavioural Disorders*. Amsterdam, Elsevier, 1985, p 305.

BIBLIOGRAFÍA

Carlock L, Vo T. The detection of a VNTR at the Huntington disease genetic marker D4S10. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1079.

Castellvi-Bel S, Matilla T, Banchs MI, Kruyer H, Corral J, Milá M, Estivill X. Chemiluminiscent detection of blotted PCR products (CB-PCR) of two CAG dynamic mutations (Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 1). *J Med Genet* 1994; **31**: 654-655.

Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* 2001; **24**: 182-188.

Cha JH, Frey AS, Alsdorf SA, Kerner JA, Kosinski CM, Mangiarini L, et al. Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; **354**: 981-989.

Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, et al. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human Huntington's disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6480-6485.

Cha JH. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci* 2000; **23**: 387-392.

Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Nat Med* 6; **2000**: 797-801.

Chong SS, Almqvist E, Telenius H, La Tray L, Nichol K, Bourdelat-Parks B, Goldberg YP, et al. Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington's disease: evidence from single sperm analyses. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 301-309.

Coleman R, Anderson D, Lovrien E. Oral motor dysfunction in individuals at risk of Huntington disease. *Am J Med Genet* 1990; **37**: 36.

Cooper JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, et al. Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 783-790.

Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP, Tjian R. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* 1989; **59**: 827-836.

Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, Antalffy B, Jiang Y, Ciechanover A, et al. Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 1999; **24**: 879-892.

BIBLIOGRAFÍA

Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Cell* 1997; **90**: 537-548.

DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Davies S, Bates G, Vonsattel J, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neuritis in brain. *Science* 1997; **277**: 1990-1993.

DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, et al. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 1995; **14**: 1075-1081.

Ding Q, Lewis JJ, Strum KM, Dimayuga E, Bruce-Keller AJ, Dunn JC, et al. Polyglutamine expansion, protein aggregation, proteasome activity, and neural survival. *J Biol Chem* 2002; **277**: 13935-13942.

Djousse L, Knowlton B, Hayden M, Almqvist EW, Brinkman R, Ross C, Margolis R, Rosenblatt A, et al. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am J Med Genet* 2003; **119A**: 279-282.

Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999; **81**: 163-221.

Doucette-Stamm LA, Riba L, Handelin B, Difilippantonio M, Ward DC, et al. Generation and characterization of Goss-Harris hybrids of human chromosome 4. *Somat Cell Mol Genet* 1991; **17**: 471-480.

Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in ice. *Nat Genet* 2000; **26**: 300-306.

Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, et al. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 2002; **296**: 2238-2243.

Durr A, Hahn-Barma V, Brice A, Pecheux C, Dode C, Feingold J. Homozygosity in Huntington's disease (letter). *J Med Genet* 1999; **36**: 172-173.

Duyao M, Ambrose C, Myers RH, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, et al. Trinucleotide repeat length: instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;**4**: 387-392.

Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, et al. Inactivation of the mouse Huntington's disease homolog Hdh. *Science* 1995; **269**: 407-410.

BIBLIOGRAFÍA

Evers-Kiebooms G, Nys K, Harper P, Zoetewij M, Durr A, Jacopini G, et al. Predictive DNA-testing for Huntington's disease and reproductive decision making: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 2002; **10**: 167-176.

Faber PW, Barnes GT, Srinidhi J, Chen J, Gusella JF, MacDonald ME. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1463-1474.

Falush D, Almquist EW, Brinkmann RR, Iwasa Y, Hayden MR. Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington's disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *Am J Hum Genet* 2000; **68**: 373-385.

Farrer LA, Connelly PM. A genetic model for age at onset in Huntington's disease. *Am J Hum Genet* 1985; **37**: 350.

Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoghi A, Ferrante KL, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2002; **22**: 1592-1599.

Ferrante RJ, et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2000; **20**: 4389-4397.

Ferrante RJ, Gutekunst CA, Persichetti F, McNeil SM, Kowall NW, Gusella JF, et al. Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *J Neurosci* 1997; **17**: 3052-3063.

Flaherty AW, Graybiel AM. Output architecture of the primate putamen. *J Neurosci* 1993; **13**: 3222-3237.

Folstein SE, Chase GA, Wahl WE, McDonnell AM, Folstein MF. Huntington's disease in Maryland: Clinical aspects of racial variation. *Am J Hum Genet* 1987; **41**: 168.

Folstein SE. Huntington's Disease. A Disorder of Families. Appendix 1. The documentation of clinical features of Huntington's disease: Clinical assessment instruments. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1989, p 189.

Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *New Eng J Med* 2003; **348**: 1365-1375.

Furtado S, Suchowersky O, Rewcastle B, Graham L, Klimek ML, Garber A. Relationship between trinucleotide repeats and neuropathological changes in Huntington's disease. *Ann Neurol* 1996; **39**: 872-874.

BIBLIOGRAFÍA

Fusco FR, Chen Q, Lamoreaux WJ, Figueredo-Cardenas G, Jiao Y, Coffman JA, et al. Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J Neurosci* 1999; **19**: 1189-1202.

Gellera C, Meoni C, Castellotti B, Zappacosta B, Girotti F, Taroni F, et al. Errors in Huntington's disease diagnostic test caused by trinucleotide deletion in the IT15 gene. *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 475-477.

Gelman MS, Kannegaard ES, Kopito RR. A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 2002; **277**: 11709-11714.

Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, et al. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 1994; **263**: 808-811.

Gerfen CR. Synaptic organization of the striatum. *J Electron Microscop Tech* 1988; **10**: 265-281.

Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 1992; **15**: 133-139.

Gerstner JA, Pedroso P, Morris J, Bergot BJ. Gram-scale purification of phosphorothioate oligonucleotides using ion-exchange displacement chromatography. *Nucleic Acid Res* 1995; **23(12)**: 2292-2299.

Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudaskis S, Gutekunst CA, Leavitt BR, Metzler M, Hackam AS, Tam J, et al. Recruitment and activation of caspase 8 by the huntingtin-interacting protein Hip-1 and novel partner Hippi. *Nature Cell Biol* 2002; **4**: 95-105.

Goldberg YP, Andrew SE, Clarke LA, Hayden MR. A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 635-636.

Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, Theilmann J, Graham RK, et al. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat Genet* 1993; **5**: 174-179.

Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, et al. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 1996; **13**: 442-449.

Gourfinkel-An I, Cancel G, Trottier Y, Devys D, Tora L, Lutz T, et al. Differential distribution of the normal and mutated forms of huntingtin in the human brain. *Ann Neurol* 1997; **42**: 712-719.

BIBLIOGRAFÍA

Grafton ST, Mazziotta JC, Pahl JJ, St. George-Hyslop P, Haines JL, Gusella J, Hoffman JM, Baxter LR, Phelps ME. A comparison of neurological, metabolic, structural, , and genetic evaluations in persons at risk for Huntington's disease. *Ann Neurol* 1990; **28**: 614.

Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 1985; **227**: 770-773.

Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. The basal ganglia and adaptative motor control. *Science* 1994; **265**: 1826-1831.

Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 1996; **39**: 385-389.

Guida M, Fenwick RG, Papp AC, Snyder PJ, Sedra M, Prior TW. Southern transfer protocol for confirmation of Huntington's disease. *Clin Chem* 1996; **42**: 1711-1712.

Gunawardena S, Her LS, Brusch RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, Sintasath L, Bonini NM, Goldstein LSB. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 2003; **40**: 25-40.

Gusella JF, MacDonald ME. Huntingtin: a single bait hooks many species. *Curr Opin Neurobiol* 1998; **8**: 425-430.

Gusella JF, MacDonald ME. Trinucleotide instability: a repeating theme in human inherited disorders. *Annu Rev Med* 1996; **47**: 201-209.

Gusella JF, Varsanyi-Breiner A, Kao FT, Jones C, Puck TT, Keys C, Orkin S, Housman DE. Precise localization of the human β -globin gene complex on chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 5239-5243.

Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983; **306**: 234-238.

Gusella JF. Location cloning strategy for characterizing genetic defects in Huntington's disease and Alzheimer's disease. *FASEB J* 1989; **3**: 2036-2041.

Gusella JF. Huntington's disease. *Adv hum Genet* 1991; **20**: 125-151.

Gutekunst CA, Levey AI, Heilman CJ, Whaley WL, Yi H, Nash NR, et al. Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8710-8714.

BIBLIOGRAFÍA

Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, et al. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 1999; **19**: 2522-2534.

Hackam AS, Singaraja R, Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, et al. The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1097-1105.

Hackam AS, Yassa AS, Singaraja R, Metzler M, Gutekunst CA, Gan L, et al. Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J Biol Chem* 2000; **275**: 41299-41308.

Haddad MS, Cummings JL. Huntington's disease. *Psychiatr Clin North Am* 1997; **20**: 791-807.

Haines JL, Conneally PM. Cause of death in Huntington's disease as reported on death certificates. *Genet Epidemiol* 1986; **3**: 417.

Hakimian R. Disclosure of Huntington's disease to family members: the dilemma of known but unknowing parties. *Genet Test* 2000; **4**: 359-364.

Hansotia P, Wall R, Berendes J. Sleep disturbances and severity of Huntington's disease. *Neurology* 1985; **35**: 1672.

Haque N and Isacson O. Antisense therapy for neurodegenerative disease? *Exp Neurol* 1997; **144**: 139-146.

Harper PS, Lim C, Craufurd D. Ten years of presymptomatic testing for Huntington's disease: the experience of the UK Huntington's Disease Prediction Consortium. *J Med Genet* 2000; **37**: 567-571.

Harper PS. Major problems in Neurology, Huntington's, 22d ed. Philadelphia, Saunders, 1991.

Hayden MR, Hewitt J, Stoessl AJ, Clarck C, Ammann W, Martin WR. The combined use of positron emission tomography and DNA polymorphisms for preclinical detection of Huntington's disease. *Neurology* 1987; **37**: 1441.

Hayden MR, MacGregor JM, Beighton PH. The prevalence of Huntington's chorea in South Africa. *A Afr Med J* 1980; **58**: 193.

Hayden MR, Soles JA, Ward RH. Age of onset in siblings of persons with juvenile Huntington's disease. *Clin Genet* 1985; **28**: 100.

Hayden MR. Huntington's Chorea. Berlin, Springer-Verlag, 1981.

Hayden MR. Huntington's Chorea in South Africa. PhD Thesis. Cape Town, South Africa, University of Cape Town, 1979.

BIBLIOGRAFÍA

Hayes CV. Genetic testing for Huntington's disease-a family issue. *N Engl J Med* 1992; **327**: 1449-1451.

Hefter H, Hömberg V, Lange HW, Freund HJ. Impairment of rapid movement in Huntington's disease. *Brain* 1987; **110**: 585.

Heiner CR, Hunkapiller KL, Chen SM, et al. Sequencing multimegabase-template DNA with Bigdye Terminator Chemistry. *Genome Research* 1998; **8**: 557-561.

Heiser V et al. Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **97**: 6739-6744.

Helle JR, Braathen GJ, Skodje T, Berg K. Diagnostic DNA testing for Huntington's disease. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2000; **120**: 2408-2410.

Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, et al. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 1999; **23**: 181-192.

Huang CC, Faber PW, Persichetti F, Mittal V, Vonsattel JP, MacDonald ME, et al. Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somat Cell Mol Genet* 1998; **24**: 217-233.

Huntington G. On chorea. *Med Surg Rep* 1872; **26**: 317.

Huntington Study Group. A randomized, placebo-controlled trial coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology* 2001; **57**: 375-376.

Hurlbert MS, Gianani RI, Hutt C, Freed CR, Kaddis FG. Neural transplantation of hNT neurons for Huntington's disease. *Cell Transplant* 1999; **8**: 143-151.

Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9436-9440.

Jana NR, Zemskov EA, Wang G, Nukina N. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome release. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1049-1059.

Jason GW, Pajurkova EM, Suchowersky O, Hewitt J, Hilbert C, Reed J, Hayden MR. Presymptomatic neuropsychological impairment in Huntington's disease. *Arch Neurol* 1988; **45**: 769.

BIBLIOGRAFÍA

Jervis GA. Huntington's chorea in childhood. *Arch Neurol* 1963; **9**: 244.

Kahlem P, Green H, Djin P. Transglutaminase action imitates Huntington's disease: selective polymerisation of huntingtin containing expanded polyglutamine. *Mol Cell* 1998; **1**: 595-601.

Kahlem P, Green H, Djin P. Transglutaminase as the agent of neurodegenerative diseases due to polyglutamine expansion. *Pathol Biol (Paris)* 1998; **46**: 681-682.

Kalchman MA, Koide HB, McCutcheon K, Graham RK, Nichol K, Nishiyama K, et al. HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* 1997; **16**: 44-53.

Karpuj MV, Garren H, Slunt H, Price DL, Gusella J, Becher MW, et al. Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7388-7393.

Kazantsev A, Walker HA, Slepko N, Bear JE, Preisinger E, Steffan JS, et al. A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nature Genet* 2002; **30**: 367-376.

Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, et al. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 2000; **20**: 7268-7278.

Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin ZH, Chen JD, et al. Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* 2002 **277**; 7466-7476.

Kiebertz K, MacDonald M, Shih C, et al. Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington's disease. *J Med Genet* 1994; **31**: 872-874.

Kim M, Lee HS, LaForet G, McIntyre C, Martin EJ, Chang P, et al. Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neurosci* 1999; **19**: 964-973.

Kim M, Velier J, Chase K, Laforet G, Kalchman MA, Hayden MR, et al. Forskolin and dopamine D1 receptor activation increase huntingtin's association with endosomes in immortalized neuronal cells of striatal origin. *Neuroscience* 1999; **89**: 1159-1167.

Kishimoto K, Nakamura M, Sotokawa Y. Population genetics study-Huntington's chorea in Japan. *Ann Rep Res Inst Environ Med* 1957; **9**: 195.

Klapstein GJ, Fisher RS, Zanzan H, Cepeda C, Jokel ES, Chesselet MF, et al. Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J Neurophysiol* 2001; **86**: 2667-2677.

BIBLIOGRAFÍA

Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, et al. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 1998; **95**: 41-53.

Koller WC, Trimble J. The gait abnormality of Huntington's disease. *Neurology* 1985; **35**:1450.

Kopyov OV, Jacques S, Lieberman A, Duma CM, Eagle KS. Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients. *Exp Neurol* 1998; **149**: 97-108.

Koroshetz WJ, Jenkins BG, Rosen BR, Beal MF. Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Ann Neurol* 1997; **41**: 160-165.

Kovtun IV, McMurray CT. Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat Genet* 2001; **27**: 407-411.

Kovtun IV, Therneau TM, McMurray CT. Gender of the embryo contributes to CAG instability in transgenic mice containing a Huntington's disease gene. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 2767-2775.

Kremer B, Clark CM, Almqvist EW, Raymond LA, Graf P, Jacova, et al. Influence of lamotrigine on progression of early Huntington disease: a randomized clinical trial. *Neurology* 1999; **53**: 1000-1011.

Kremer B, Goldberg YP, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, et al. A worldwide study of the Huntington's disease mutation: the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl Med* 1994; **330**: 1401-1406.

Krobitsch S, Lindquist S. Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 1589-1594.

Kurtzke JF, Anderson VE, Beebe GW, Elston RC, Higgins I, Hogg J, Kurland L, Muentner M, Myriantopoulos N, Reed te, et al. Report of workgroup on epidemiology, biostatistics and population genetics, in Commission for the Control of Huntington's Disease and its Consequences. DHEW publication (NIH) 718-1503, Washington, DC, Government Printing Office, 1977, vol. 3, p 133.

Laccone F, Christian W. A recurrent expansion of a maternal allele with 36 CAG repeats causes Huntington disease in two sisters. *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 1145-1148.

Landwehrmyer GB, McNeil SM, Dure LS, Ge P, Aizawa H, Huang Q, et al. Huntington's disease gene: regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 1995; **37**: 218-230.

BIBLIOGRAFÍA

Lange H, Thorner G, Hopf A, Schroder KF. Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J Neurol Sci* 1976; **28**: 401-425.

Lanska DJ, Lanska MJ, Lavine L, Schoenberg BS. Conditions associated with Huntington's disease at death. A case-control study. *Arch Neurol* 1988; **45**: 878.

Lanska DJ, Lavine L, Lanska MJ, Schoenberg BS. Huntington's disease mortality in the United States. *Neurology* 1988; **38**: 769.

Latimer LJP, Lee JS. Ethidium bromide does not fluorescence when intercalated adjacent to 7-deazaguanine in duplex DNA. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13849-13851.

Leavitt BR, Guttman JA, Hodgson JG, Kimel GH, Singaraja R, Vogl AW, et al. Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 313-324.

Leavitt BR, Wellington CL, Hayden MR. Recent insights into the molecular pathogenesis of Huntington's disease. *Semin Neurol* 1999; **19**: 385-395.

Lecerf JM, et al. human single-chain Fv intrabodies counteract *in situ* huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 4754-4769.

Leeflang EP, Zhang L, Tavar S, Hubert R, Srinidhi R, MacDonald ME, Myers RH, et al. Single sperm analysis of the trinucleotide repeats in the Huntington's disease gene: quantification of the mutation frequency spectrum. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1519-1526.

Legius E, Cuppens H, Dierick H, Van Zandt K, Dom R, Fryns J-P, Evers-Kiebooms G, et al. Limited expansion of the (CAG)_n repeat of the Huntington gene: a permutation. *J Hum Genet* 1994; **2**: 44-50.

Leopold NA, Kagel MC. Dysphagia in Huntington's disease. *Arch Neurol* 1985; **42**: 57-60.

Lesort M, Chun W, Jonson GV, Ferrante RJ. Tissue transglutaminase is increased in Huntington's disease brain. *J Neurochem* 1999; **73**: 2018-2027.

Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, Vargas ME, et al. Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 1999; **58**: 515-532.

Li H, Li SH, Johnston H, Shelbourne PF, Li XJ. Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet* 2000; **25**: 385-389.

BIBLIOGRAFÍA

Li SH, Cheng AL, Li H, Li XJ. Cellular defects and altered gene expression in PC12 cells stably expressing mutant huntingtin. *J Neurosci* 1999; **19**: 5159-5172.

Li SH, Li XJ. Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 777-782.

Li SH, Schilling G, Young WS, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, et al. Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 1993; **11**: 985-993.

Li XJ, Li SH, Sharp AH, Nucifora FC Jr, Schilling G, Lanahan A, et al. A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 1995; **378**: 398-402.

Liu YF, Deth RC, Devys D. SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signalling complexes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 8121-8124.

Liu YF, Dorow D, Marshall J. Activation of MLK2-mediated signalling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin. *J Biol Chem* 2000; **275**: 19035-19040.

Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL, Trottier Y. Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasm and nuclear inclusions. *Mol Cell* 2002; **10**: 259-269.

Lunkes A, Mandel JL. A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1355-1361.

Luthi-Carter R, Hanson SA, Strand AD, Bergstrom DA, Chun W, Peters NL, et al. Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1911-1926.

Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, et al. Decreased expression of striatal signalling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1259-1271.

Maat-Schieman ML, Dorsman JC, Smoor MA, Siesling S, Van Duinen SG, Verschuuren JJ, et al. Distribution of inclusions in neuronal nuclei and dystrophic neuritis in Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: 129-137.

MacDonald ME, Cheng SV, Zimmer m, Haines JL, Poutska AM, Allitto BA, et al. Clustering of multi-allele DNA markers near the Huntington's disease gene. *J Clin Invest* 1989a; **84**: 1013-1016.

MacDonald ME, Haines JL, Zimmer M, Cheng SV, Youngman S, et al. Recombination events suggest possible locations for the Huntington's disease gene. *Neuron* 1989b; **3**: 183-190.

BIBLIOGRAFÍA

MacDonald ME, Lin C, Sniridhi L, Bates G, Altherr M, Whaley WL, Lehrach H, Wasmuth J, Gusella JF. Complex patterns of linkage disequilibrium in the Huntington's disease region. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 723-734.

MacDonald ME, Novelletto A, Lin C, Tagle D, Barnes G, Bates G, Taylor S, Allitto B, et al. The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nature Genet* 1992; **1**: 99-103.

Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, et al. Exon 1 of the Huntington's disease gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996; **87**: 493-506.

Manley K, et al. MSH2 deficiency prevents *in vivo* somatic instability of the CAG repeat in hd transgenic mice. *Nat Genet* 1999; **23**: 471-473.

Margolis RL, Stine OC, Callahan C, Rosenblatt A, Abbott MH, Sherr M, et al. Two novel single-base-pair substitutions adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene (IT15): implications for diagnostic testing (Letter). *Am J Hum Genet* 1999; **64**: 323-326.

Martín-Aparicio E, Yamamoto A, Hernández F, Hen R, Ávila J, Lucas JJ. Proteosomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2001; **21**: 8772-8781.

Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, et al. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 1998; **18**: 150-154.

Matthews RT, et al. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal model of Huntington's disease. *J Neurosci* 1998; **18**: 156-163.

McCampbell A, Taye AA, Whitty L, Penney E, Steffan JS, Fischbeck KH. Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 15179-15184.

McInnis MG. Anticipation –an old idea in new genes. *Am J Hum Genet* 1996; **4**:387-392.

McNeil SM, Novelletto A, Srinidhi J, Barnes G, Kornbluth I, Altherr MR, Wasmuth JJ, et al. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 775-779.

BIBLIOGRAFÍA

Metzler M, Chen N, Helgason CD, Graham RK, Nichol K, McCutcheon K, et al.

Life without huntingtin: normal differentiation into functional neurons. *J Neurochem* 1999; **72**: 1009-1018.

Meissen GJ, Myers RH, Mastromauro CA, Korosetz WJ, Klinger KW, Farrer

LA, Watkins PA, Gusella JF, Bird ED, Martin JB. Predictive testing for Huntington's disease with use of a linked DNA marker. *N Engl J Med* 1988; **318**: 535-542.

Milunsky JM, Maher TA, Loose BA, Darras BT, Ito, M. XL PCR for the detection

of large trinucleotide expansions in juvenile Huntington's disease. *Clin Genet* 2003; **64**: 70-73.

Modregger J, DiProspero NA, Charles V, Tagle DA, Plomann M. PACSIN 1

interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Cel* 2002; **11**: 2547-2558.

Morris M, Tyler A. Management and therapy, in Harper PS (ed): Huntington's Disease. London, Saunders, 1991, p 205.

Muglia M, Leone O, Annesi G, Gabriele AL, Imbrogno E, Grandinetti C,

Conforti FL, Naso F, Brancati C. Nonisotopic method for accurate detection of (CAG)_n repeats causing Huntington's disease. *Clin Chem* 1996; **42**: 1601-1603.

Mullis K, Faloona F, Sharf F, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; **51** Pt 1: 263-273.

Murphy KP, Carter RJ, Lione LA, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, et al. Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 2000; **20**: 5115-5123.

Myers RH, Leavitt J, Farrer LA, Jagadeesh J, McFarlane H, Mastromauro CA, Mark RJ, Gusella JF. Homozygote for Huntington's disease. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 615.

Myers RH, Sax DS, Schoenfeld M, Bird ED, Wolf PA, Vonsattel JP, White RF, Martin JB. Late onset of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; **48**: 530.

Nagai Y et al. Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening. *J Biol Chem* 2001; **275**: 10437-10442.

Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima T, et al. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1441-1448.

BIBLIOGRAFÍA

Nance MA, for the Huntington's disease Genetic Testing Group. Genetic testing of children at-risk for Huntington's disease. *Neurology* 1997; **49**: 1048-1053.

Nance MA, Mathias-Hagen V, Breningstall G, et al. Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* 1999a; **52**: 392-394.

Nance MA, Myers RH. Juvenile onset Huntington's disease—clinical and research perspectives. *MRDD Research Reviews* 2001; **7**: 153-157.

Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, et al. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioural and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 1995; **81**: 811-823.

Newcombe RG. A life table for onset of Huntington's chorea. *Ann Hum Genet* 1981; **45**: 375.

Norremolle A, Riess O, Epplen JT, Fenger K, Hasholt L, Sorenson SA. Trinucleotide repeat elongation in the Huntington gene in Huntington disease patients from 71 Danish families. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1475.

Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, et al. Interference by huntingtin and atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001; **291**: 2423-2428.

Oepen G, Clarenbach P, Thoden U. Disturbance of eye movements in Huntington's chorea. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1981; **229**: 205.

Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, et al. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 1999; **399**: 263-267.

Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearly JA, Wiener HW, et al. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 1997; **91**: 753-763.

Osborne JP, Munson P, Burman D. Huntington's chorea. Report of 3 cases and review of the literature. *Arch Dis Child* 1982; **57**: 99.

Palo J, Somer H, Ikonen E, Karila L, Peltonen L. Low prevalence of Huntington's disease in Finland (letter). *Lancet* 1987; **2**: 805.

Passani LA, Bedford MT, Faber PW, McGinnis KM, Sharp AH, Gusella JF, et al. Huntingtin's WW domain partners in Huntington's disease post-mortem brain fulfil genetic criteria for direct involvement in Huntington's disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 2175-2182.

BIBLIOGRAFÍA

Pecheux C, Mouret J-F, Durr A, Agid Y, Feingold J, Brice A, et al. Sequence analysis of the CCG polymorphic region adjacent to the CAG triplet repeat of the HD gene in normal and HD chromosomes. *J Med Genet* 1995; **32**: 399-400.

Penney JB Jr, Young AB, Shoulson I, Starosta-Rubenstein S, Snodgrass SR, Sanchez-Ramos J, Ramos-Arroyo M, Gomez F, Penschaszadeh G, Alvir J. Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Mov Disord* 1990; **5**: 93.

Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 5355-5358.

Perutz MF. Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr Opin Struct Biol* 1996; **6**: 848-858.

Peters MF, Nucifora FC Jr, Kushi J, Seaman HC, Cooper JK, Herring WJ, et al. Nuclear targeting of mutant huntingtin increases toxicity. *Mol Cell Neurosci* 1999; **14**: 121-128.

Peters MF, Ross CA. Isolation of a 40 kDa huntingtin-associated protein. *J Biol Chem* 2000.

Pillon B, Dubois B, Ploska A, Agid Y. severity and specificity of cognitive impairment in Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1991; **41**: 634.

Podoll K, Caspary P, Lange HW, Noth J. Language functions in Huntington's disease. *Brain* 1988; **111**: 1475.

Pohl TM, Zimmer M, MacDonald ME, Smith B, Bucan M, Poutska A, et al. Construction of a NotI linking library and isolation of new markers close to the Huntington's disease gene. *Nucl Acids Res* 1988; **16**: 9185-9198.

Pratley RE, Salbe AD, Ravussin E, Caviness JN. Higher sedentary energy expenditure in patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* 2000; **47**: 64-70.

Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* 1998; **282**: 1079-1083.

Pridmore SA. Age of death and duration in Huntington's disease in Tasmania. *Med J Aust* 1990; **153**: 137.

Pridmore SA. The prevalence of Huntington's disease in Tasmania. *Med J Aus* 1990; **153**: 133.

Quinn N, Schrag A. Huntington's disease and other choreas. *J Neurol* 1998; **245**: 709-716.

BIBLIOGRAFÍA

Ranen NG, Stine OC, Abbott MH, et al. Anticipation and instability of (CAG)_n repeats in IT-15 in parent-offspring pairs with Huntington's disease. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 593-602.

Raskin S, Allan N, Teive HA, Cardoso F, Haddad MS, Levi G, Boy R, Lerena JrJ, et al. Huntington's disease: DNA analysis in Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; **58**: 977-985.

Reddy PH, Williams M, Charles V, Garrett L, Pike-Buchanan L, Whetsell WO Jr, et al. Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in Huntington's disease transgenic mice expressing mutated full-length Huntington's disease cDNA. *Nat Genet* 1998; **20**: 198-202.

Reed TE, Chandler JH, Hughes EM, Davidson RT. Huntington's chorea in Michigan. I. Demography and genetics. *Am J Hum Genet* 1958; **10**: 201.

Reik W. Genomic imprinting: A possible mechanism for the parental origin effect in Huntington's chorea. *J Med Genet* 1988; **25**: 805.

Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5733-5737.

Ridley RM, Frith CD, Crow TJ, Conneally PM. Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. *J Med Genet* 1988; **25**: 589.

Ridley RM, Frith CD, Farrer LA, Conneally PM. Patterns of inheritance of the symptoms of Huntington's disease suggestive of an effect of genomic imprinting. *J Med Genet* 1991; **28**: 224.

Riess O, Noerremoelle A, Soerensen SA, Epplen J. Improved PCR conditions for the stretch of (CAG)_n repeats causing Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 637.

Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, et al. Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 2000; **20**: 3705-3713.

Rosas HD, Koroshetz WJ, Jenkins BG, Chen YI, Hayden DL, Beal MF, et al. Riluzole therapy in Huntington's disease. *Mov Disord* 1999; **14**: 326-330.

Rosembun BB, Lee LG, Spurgeon SL, et al. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acid Res* 1997; **25(22)**: 4500-4504.

BIBLIOGRAFÍA

Rosenblatt A, Brinkman RR, Liang KY, Almqvist EW, Margolis RL, Huang CY, Sherr M, Franz ML, Abbott MH, Hayden MR, Ross CA. Familial influence on age of onset among siblings with Huntington's disease. *Am J Hum Genet* 2001; **105**: 399-403.

Rosenblatt A, Leroi I. Neuropsychiatry of Huntington's disease and other basal ganglia disorders. *Psychosomatics* 2000; **41**: 24-30.

Ross CA. Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* 1997; **19**: 1147-1150.

Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Ramesar RS, Old J, et al. Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nat Genet* 1994; **7**: 525-530.

Rubinsztein DC, Barton DE, Davison BC, Ferguson-Smith MA. Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1713-1715.

Rubinsztein DC, Leggo J, Barton DE, Ferguson-Smith MA. Site of (CCG) polymorphism in the Huntington's disease gene. *Nat Genet* 1993; **5**: 214-215.

Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman J-J, Chotai K, et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington's disease gene reveals Huntington's disease cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 16-22.

Sanchez A, Castellví-Bel S, Mila M, Genis D, Calopa M, Jimenez D, Estivill X. Huntington's disease: confirmation of diagnosis and presymptomatic testing in Spanish families by genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; **61**: 625-627.

Sanchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 1999; **22**: 623-633.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74(12)**: 5463-5467.

Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, et al. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 1997; **42**: 604-612.

BIBLIOGRAFÍA

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998; **95**: 55-66.

Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, et al. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 1997; **90**: 549-558.

Scherzinger E, Sittler A, Schweiger K, Heiser V, Lurz R, Hasenbank R, et al. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4604-4609.

Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuk JA, et al. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 397-407.

Seela F, Röling A. 7-Deazapurine containing DNA: efficiency of c7dGTP, c7dATP, c7dTTP incorporation during PCR-amplification and protection from endodeoxyribonuclease hydrolysis. *Nucleic Acid Res* 1992; **20**: 55-61.

Sharp AH, Love SJ, Schilling G, Li SH, Li XJ, Bao J, et al. Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 1995; **14**: 1065-1074.

Shelbourne PF, Killeen N, Hevner RF, Johnston HM, Tecott L, Lewandoski M, et al. A Huntington's disease CAG expansion at the murine *Hdh locus* is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 763-774.

Sieradzan KA, Mehan AO, Jones L, Wanker EE, Nukina N, Mann DM. Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp Neurol* 1999; **156**: 92-99.

Singaraja R, Hadano S, Metzler M, Givan S, Wellington CL, Warby S, Yanal A, Gutekunst CA, et al. HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 2815-2828.

Sipione S, Rigamonti D, Valenza M, Zuccato C, Conti L, Pritchard J, Kooperberg C, et al. Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1953-1965.

Sittler A, et al. Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1307-1315.

BIBLIOGRAFÍA

Sittler A, Walter S, Wedemeyer N, Hasenbank R, Scherzinger E, Eickhoff H, et al. SH3GL3 associates with the huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyGln-containing protein aggregates. *Mol Cell* 1998; **2**: 427-436.

Snell RG, Lazarou L, Youngman S, QuRRELL owl, Wasmuth JJ, Shaw DJ, Harper PS. Linkage disequilibrium in Huntington's disease: an improved localization for the gene. *J Med Genet* 1989; **26**: 673-675.

Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, et al. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; **4**: 393-397.

Snell RG, Thompson LM, Tagle DA, Holloway TL, Barnes G, Harley HG, Sandkuijl LA, et al. A recombination event that redefines the Huntington's disease region. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 357-362.

Sotrel A, Williams RS, Kaufmann WE, Myers RH. Evidence for neuronal degeneration and dendritic plasticity in cortical pyramidal neurons of Huntington's disease: a quantitative Golgi study. *Neurology* 1993; **43**: 2088-2096.

Squitieri F, Gellera C, Cannella M, Mariotti C, Cislighi G, Rubinsztein DC, Alqvist EW, Turner D, et al. Homozygosity for CAG mutation in Huntington's disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 2003; **126**: 946-955.

Srivastava T, Lal V, Prabhakar S. Juvenile Huntington's disease (letter). *Neurol India* 1999; **47**: 340-341.

Standaert DG, Young AB. Treatment of central nervous system degenerative disorders. In Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9 ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 503-517.

Starkstein SE, Brandt J, Folstein S, Strauss M, Berthier ML, Pearlson GD, Wong D, McDonnell A, Folstein M. Neuropsychological and neuroradiological correlates in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; **51**: 1259.

Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, et al. Histone acetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 2001; **413**: 739- 743.

Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, et al. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6763-6768.

Strange PG. New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem Int* 1993; **22**: 223-236.

BIBLIOGRAFÍA

Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitisation of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 2001; **276**: 24713-24718.

Szebenyi G, Morfini GA, Babcock A, Gould M, Selkoe K, Stenoien DL, Young M, et al. Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron* 2003; **40**: 41-52.

Tabrizi SJ, Blamire AM, Manners DN, Rajagopalan B, et al. Creatine therapy for Huntington's disease: clinical and MRS findings in a 1-year pilot study. *Neurology* 2003; **61**: 141-142.

Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 1999; **45**: 25-32.

Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, et al. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol* 2000; **47**: 80-86.

Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, et al. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington's disease. *Nature Med* 2004; **10**: 148-154.

Taylor SAM, Snell RG, Buckler A, Ambrose C, Duyao M, Church D, Lin C, et al. Cloning of the α -adducine gene from the Huntington's disease candidate region of chromosome 4 by exon amplification. *Nature Genet* 1992; **2**: 223-227.

Telenius H, Almqvist E, Kremer B, Spence N, Squitieri F, Nichol K, Grandell U, et al. Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)_n changes in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 189-195.

Telenius H, Kremer HPH, Theilmann J, Andrew SE, Almqvist E, Anvret M, Breenberg C, Greenberg J, Lucotte G, Squitieri FS, Starr E, Goldberg YP, Hayden MR. Molecular analysis of juvenile Huntington's disease: The major influence of paternal descent on (CAG)_n repeat length. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1534.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; **72**: 971-983.

Theilman J, Kanani S, Shiang R, Robbins C, Quarrell O, Huggins M, Hedrick A, Hayden MR. Non-random association between alleles detected at D4S95 and D4S98 and the Huntington's disease gene: *J Med Genet* 1989; **26**: 676-681.

BIBLIOGRAFÍA

Thompson LM, Plummer S, Schalling M, Altherr MR, Gusella JF, Housman DE, Wasmuth JJ. A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington's disease gene region of human chromosome 4. *Genomics* 1991; **11**: 1133-1142.

Thompson PD, Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Dick JP, Benecke R, Marsden CD. The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. *Brain* 1988; **111**: 223.

Tobin AJ, Signer ER. Huntington's disease: the challenge for the cell biologist. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 531-536.

Tóth T, Findlay I, Nagy B, Papp Z. Accurate sizing of (CAG)_n repeats causing Huntington's disease by fluorescence PCR. *Clin Chem* 1997a; **43**: 2422-2423.

Tóth T, Nagy B, Papp Z. PCR reagents for detection of (CAG)_n repeats in Huntington's disease. *Clin Chem* 1997b; **43**: 1463.

Tóth T, Némethi M, Papp Z. Detection of (CAG)_n repeats using silver staining in patients with Huntington's disease in Hungary. *Am J Med Genet* 1997c; **70**: 448-449.

Tsai G, Goff DC, Chang RW, Flood J, Baer L, Coyle JT. Markers of glutamatergic neurotransmission and oxidative stress associated with tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 1998; **155**: 1207-1213.

Tukamoto T, Nukina N, Ide K, Kanazawa I. Huntington's disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Brain Res Mol* 1997; **51**: 8-14.

Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad USA* 2000; **97**: 8093-8097.

Usdin MT, Shelbourne PF, Myers RM, Madison DV. Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 839-846.

Valdes Jm, Tagle DA, Elmer LW, Collins FS. A simple nonradioactive method for diagnosis of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 633-634.

Van Vugt JP, Siesling S, Piet KK, Zwinderman AH, Middelkoop HA, Van hiltten JJ, et al. Quantitative assessment of daytime motor activity provides a responsive measure of functional decline in patients with Huntington's disease. *Mov Disord* 2001; **16**: 481-488.

BIBLIOGRAFÍA

Van Vugt JP, Siesling S, Vergeer M, Van der Velde EA, Roos RA. Clozapine versus placebo in Huntington's disease: a double blind randomized comparative study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; **63**: 35-39.

Velier J, Kim M, Schwarz C, Kim TW, Sapp E, Chase K, et al. Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol* 1998; **152**: 34-40.

Verbessen P, Lemiere J, Eijnde BO, Swinnen S, Vanhees L, et al. Creatine supplementation in Huntington's disease: a placebo-controlled pilot trial. *Neurology* 2003; **61**: 925-930.

Vetter IR, Arndt A, Kutay U, Gorlich D, Wittinghofer A. Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* 1999; **97**: 535-646.

Vogel F, Motuksky AG. Human Genetics, 2d ed. New York, Springer-Verlag, 1986.

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; **44**: 559.

Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, et al. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggregates-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 1393-1407.

Wanker EE, Rovira C, Scherzinger E, Hasenbank R, Walter S, Tait D, et al. HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 487-495.

Watts C and Dunnett SB. Towards a protocol for the preparation and delivery of striatal tissue for clinical trials of transplantation in Huntington's disease. *Cell Transplant* 2000; **9**: 223-234.

Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, et al. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9158-9167.

Wellington CL, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, et al. Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 19831-19838.

Wendt GG, Landzettel I, Unterreiner I. Erkrankungsalter bei der Huntingtonschen Chorea. *Acta Genet (Basel)* 1959; **9**: 18.

Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Sholson I, Gomez F, Ramos Arroyo MA. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 1987; **326**: 194.

BIBLIOGRAFÍA

Whaley WL, Bates Gp, Novelletto A, Sedlacek Z, Cheng S, Romano D, Ormondroyd E, et al. Mapping of cosmid clones in the Huntington's disease region of chromosome 4. *Somat Cell Mol Genet* 1991; **17**: 83-91.

Wheeler VC, White JK, Gutekunst CA, Vrbanac V, Weaver M, Li XJ, et al. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 503-513.

White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, et al. Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* 1997; **17**: 404-410.

Wytenbach A, Carmichael J, Swartz J, Furlong RA, Narain Y, Rankin J, et al. Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 2898-2903.

Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 2000; **101**: 57-66.

Young AB, Shoulson, Penney JB, Starosta-Rubinstein S, Gómez F, Travers H, Ramos-Arroyo MA, Snodgrass SR, Bonilla E, Moreno H. Huntington's disease in Venezuela: Neurologic features and functional decline. *Neurology* 1986; **36**: 244.

Youngman S, Bates GP, Williams S, McClatchey AI, Baxendale S, Sedlacek Z, Altherr M, et al. The telomeric 60 kb of chromosome arm 4p is homologous to telomeric regions on 13p, 15p, 21p, and 22p. *Genomics* 1992; **14**: 350-356.

Yu S, Fimmel A, Fung D, Trent RJ. Polymorphisms in the CAG repeat-a source of error in Huntington disease DNA testing. *Clin Genet* 2000; **58**: 469-472.

Yu ZX, Li SH, Nguyen HP, Li XJ. Huntingtin inclusions do not deplete polyglutamine-containing transcription factors in Huntington's disease mice. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 905-914.

Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 1995; **11**: 155-163.

Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, et al. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 2002; **33**: 849-860.

BIBLIOGRAFÍA

Zoghbi HY, Orr HT. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2000; **23**: 217-247.

Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001; **14**:14.

Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt B, et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genet* 2003; **35**: 76-83.

Zühlke C, Olaf R, Bockel B, et al. Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in the Huntington's disease gene. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 2063-2067.