



UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ESTANDARIZACIÓN DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE LA
MUTACIÓN DEL GEN *HTT* EN LA ENFERMEDAD DE
HUNTINGTON.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: LUCIANO MARTINEZ SEPULVEDA.
PROFESOR GUÍA: Dr. ERNESTO SOLIS

TALCA – CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

ÍNDICE

	Pág.
1- Resumen.	6
2- Introducción.	7
3- Marco teórico.	10
3.1- Enfermedad de Huntington y su etiología.	10
3.2- Epidemiología de la enfermedad de Huntington.	11
3.3- Manifestaciones clínicas.	13
3.4- Trastorno del movimiento: Corea y otros.	16
3.5- Trastornos neuropatológicos.	19
3.6- Aspectos genéticos moleculares: Gen de la huntingtina (<i>HTT</i>)	20
3.7- Diagnostico para la enfermedad de Huntington.	20
3.8- Protocolo para pruebas genéticas para la enfermedad de Huntington	24
3.9- Extracción de ADN para la PCR.	26
3.10- Reacción en cadena de la polimerasa.	27
3.11- Aplicaciones de una PCR.	29
3.12- Medidas para optimizar la PCR.	29
3.13- Sensibilidad y especificidad de la técnica.	30
3.14- Concepto de estandarización de la PCR.	35
4- Hipótesis y objetivos.	37
4.1- Objetivo general.	37
4.2- Objetivos específicos.	37
5- Metodología.	38
5.1- Extracción de ADN.	38
5.2- Cuantificación del ADN.	39
5.3- Reacción de PCR.	39
5.4- Modificación de la mezcla de reacción y programa de PCR.	40
5.4.1- Variación de la concentración de cloruro de magnesio.	40

5.4.2- Variación de la concentración de aditivo 360 GC de la <i>Taq</i> polimerasa.	41
5.4.3- Variación de la concentración de ADN.	41
5.4.4- Variación del número de ciclos de amplificación.	41
5.4.5- Variación de la temperatura de alineamiento de los iniciadores.	42
5.5- Verificación del producto amplificado.	42
6- Resultados.	44
7- Discusión.	50
8- Conclusión.	58
9- Bibliografía	60

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Frecuencia de la enfermedad de Huntington según edad	14
Figura 2: Ciclo de vida de la enfermedad de Huntington	16
Figura 3: Esquema de las vías de señalización alteradas en Huntington	18
Figura 4: Frecuencia de repeticiones de CAG normal y expandido	22
Figura 5: Atrofia prodrómica en RMN	23
Figura 6: Rango de repeticiones CAG en el gen <i>HTT</i>	34
Figura 7: Variación de la concentración de cloruro de magnesio	45
Figura 8: Variación del aditivo comercial	46
Figura 9: Variación de la concentración de ADN	47
Figura 10: Variación del número de ciclos	48
Figura 11: Variación de la temperatura de alineamiento de iniciadores	49
Figura 12: Variación extendida de la temperatura de alineamiento de iniciadores	49
Tablas:	
Tabla 1: Preparación de mezcla de PCR con variación de concentración cloruro de magnesio.	44
Tabla 2: Preparación de mezcla de PCR con variación de volumen del aditivo	63
Tabla 3: Preparación de la mezcla para PCR con ADN a diferentes Concentraciones	63
Tabla 4: Preparación de la mezcla para muestra de ADN a diferentes Concentraciones	64
Tabla 5: Preparación de la mezcla estándar para PCR utilizada con variaciones número de ciclos y temperaturas de anillado	64
Tabla 6: Preparación estándar de mezcla para PCR.	64
Tabla 7: Revisión y comparación sistémica de protocolos de PCR para la enfermedad de Huntington.	65

1- RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa con herencia autosómica dominante que afecta el sistema nervioso central y más predominantemente a los núcleos basales, caracterizada por movimientos involuntarios tipo corea, alteraciones psiquiátricas y deterioro cognitivo. Se origina por una mutación tipo expansión del trinucleótido CAG del extremo 5', en el exón 1 del gen que codifica la proteína Huntingtina (*HTT*), localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Actualmente en Chile la prueba diagnóstica suele ser poco accesible debido a su alto costo. Es por ello entonces, que el objetivo de este estudio fue estandarizar un protocolo de PCR para la detección de la mutación del gen *HTT* en la enfermedad de Huntington, mucho más económico, y acorde a la realidad de los centros de salud del país. Las variables implicadas en la estandarización fueron: concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), porcentaje del aditivo para la *Taq* polimerasa, concentración de ADN, número de ciclos de la PCR y cambio de la temperatura de alineamiento de iniciadores. Estas fueron aplicadas a una muestra de paciente sano (sin la mutación) y a una muestra de paciente que presentaba signos de la enfermedad (con la mutación), ambos con resultado de prueba genética conocido y confirmado por PCR y electroforesis capilar en laboratorio externo.

Se encontró que las condiciones óptimas tanto para la mezcla de reacción de PCR, como para el programa de amplificación fueron: concentración de 2mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 100 ng/uL de ADN, 10% de aditivo, temperatura de anillado de iniciadores de 65°C y 30 ciclos en la reacción, verificado en un gel de agarosa al 2%. Por lo tanto, se estandarizaron los parámetros de la reacción de PCR convencional que permitirían la detección de la mutación del gen *HTT* en la enfermedad de Huntington para su respectiva validación y caracterización específica en geles de poliacrilamida.

2- INTRODUCCION

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa con herencia autosómica dominante que afecta el sistema nervioso central y más predominantemente a los núcleos basales, caracterizada por movimientos involuntarios tipo corea, alteraciones psiquiátricas y deterioro cognitivo .(1) Es de tipo hereditaria, con un patrón de transmisión autosómico dominante y de aparición tardía, con penetrancia completa en portadores del alelo mutado con 40 o más repeticiones del trinucleótido CAG (citosina, adenina, guanina). Esto implica que todos los individuos que hereden el alelo mutado eventualmente desarrollarán la enfermedad, a menos que mueran de otras causas antes del inicio de los síntomas. (2)

El gen involucrado fue clonado en el año 1993. (3) La mutación consiste en una expansión del trinucleótido CAG, cerca del extremo 5', en el exón 1 del gen localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). que inicialmente fue denominado *IT15* (del inglés interesting transcript 15), y que actualmente se conoce como *HTT*. La expansión CAG se traduce en una proteína huntingtina defectuosa con un segmento de poliglutaminas (poliQ) cercana al extremo amino terminal. (4)

A pesar de que la edad de inicio o en la que se pueden presentar las primeras manifestaciones clínicas se describe como un fenómeno variable, suele ocurrir entre la tercera y quinta década de vida, lo que en términos generales se considera como una enfermedad de aparición tardía. La edad de inicio de los síntomas motores se correlaciona inversamente con el número de repeticiones. Entre más alta es la cantidad de estas repeticiones, los síntomas motores se presentan a menor edad. Este hecho se conoce con el nombre de fenómeno de anticipación. A pesar de que el número de repeticiones explica un porcentaje importante de la variabilidad en la edad de inicio, aún permanece una fracción que no puede ser atribuido a éste y donde se piensa pueden intervenir otros genes modificadores.

La distribución mundial de la enfermedad es similar entre hombres y mujeres. El origen de la enfermedad según los estudios genealógicos estaría en países como Francia, Alemania y Holanda (oeste de Europa), con posterior dispersión hacia Australia, Inglaterra, Sudáfrica y América. Las mayores tasas de prevalencia ocurren en la costa occidental del lago de Maracaibo de Venezuela, luego en la isla de Tasmania (Sur de Australia) y en Moray Firth de Escocia. (5)

En Chile, Cruz Cocke (6) indica una prevalencia aproximada de 1:25.000 habitantes para el año 1994. Sin embargo, hasta la fecha no se tiene otro estudio nacional más actualizado. Esto limita el desarrollo de políticas públicas que vayan en beneficio de estas personas, el acceso a pruebas diagnósticas y a los tratamientos correspondientes. La aplicación temprana de la reacción en cadena de la polimerasa PCR como método diagnóstico es un aporte para el manejo clínico y asesoramiento genético de los pacientes, mejorando considerablemente la calidad de vida de los mismos y sus familias.

El centro de trastornos del movimiento (CETRAM), es una organización que junto con la agrupación chilena de Huntington trabaja en brindar una atención integral y multidisciplinaria a las familias con EH, muchas de las cuales no han tenido el debido acceso a la prueba genética para confirmar su diagnóstico. Teniendo en cuenta esto último, es que se ha generado la colaboración conjunta con el laboratorio de medicina molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca con el fin de estandarizar un protocolo de PCR convencional que permita obtener resultados confiables y estandarizados para la detección de la mutación en un gel de agarosa, que discrimine en un primer paso según la aparición de las bandas la presencia o no de una mutación y que posteriormente permita la determinación del número exacto de repeticiones CAG en geles de poliacrilamida y su validación como prueba diagnóstica. La particularidad de esta estrategia por sobre la serie de técnicas moleculares existentes que utilizan electroforesis capilar o secuenciación de Sanger para detectar expansiones CAG en el gen *HTT* radica en la accesibilidad, ya que los reactivos, el equipamiento y los insumos para una PCR convencional, en general, son de menor costo. Además, se debe mencionar que esto viene a ser la primera estandarización de una técnica

de diagnóstico para enfermedad genética en la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca, por lo que, este estudio constituye un paso hacia adelante en la búsqueda de la aplicación del concepto de salud como un derecho ciudadano y en el necesario desarrollo del diagnóstico de enfermedades genéticas en la Región del Maule.

3- MARCO TEÓRICO

3.1- Enfermedad de Huntington y su etiología.

La enfermedad de Huntington (EH), conocida también con el nombre de el “mal de San Vito” por los movimientos aberrantes asimilables a un tipo de baile que sufren los pacientes. Esta enfermedad fue descrita en el año 1872 por el médico norteamericano George Summer Huntington, quien hizo el primer estudio clínico completo y detallado de una enfermedad familiar, cuyos primeros pacientes habían sido estudiados junto a su abuelo y su padre en Long Island, Nueva York. Este estudio describía como principal característica de la enfermedad un espasmo clónico que afectaba a los músculos voluntarios, donde no había pérdida de voluntad frente a estas contracciones, pero el poder de ésta sobre los músculos involucrado era deficiente. (7)

La EH se presenta como una patología de tipo neurológica, hereditaria y altamente degenerativa. En condiciones normales el triplete CAG del gen *HTT* codifica para el aminoácido glutamina de la proteína huntingtina, pero cuando ocurre la mutación y se genera una expansión considerable del triplete CAG, esta se traduce en un aumento también del número de glutaminas en la proteína con su consiguiente disfunción y la posterior aparición de la enfermedad neurológica. Por su naturaleza molecular, esta patología pertenece al grupo de las poliQ, o mejor conocida como enfermedades causadas por poliglutaminas. Dentro de los cuadros similares de este grupo está la ataxia espinocerebelosa, el síndrome de X frágil, la ataxia de Friedreich y atrofia muscular bulbo espinal (enfermedad de Kennedy). El tipo de herencia se describe como autosómica dominante, donde las manifestaciones clínicas se generan a partir de la superación de un umbral de repeticiones CAG (≥ 40). (8)

La huntingtina tiene una expresión ubicua en diferentes tipos celulares, tiene un alto número de interacciones con otras moléculas y si bien, la función principal no es conocida del todo, se sabe que está presente en funciones de apoyo en la regulación transcripcional, el desplazamiento nucleocitoplasmático, la función sináptica y la actividad antiapoptótica. (9)

La proteína es de amplia distribución, pero la región anatómica principalmente afectada es el cuerpo estriado, específicamente en las neuronas gabaérgicas de proyección espinal media, tanto de la de vía dopaminérgica directa como la de vía indirecta. Esta última está encargada de suprimir los movimientos inapropiados y es la que se ve afectada de forma más inmediata, por ende, responsables de los movimientos coreicos clásicos.

El metabolismo celular también sufre alteraciones, esto se ha podido comprobar en cerebros postmortem en los que se evidencian procesos metabólicos interrumpidos, y disfunción energética en tejido neuronal y muscular. Guardando así, directa relación con la disminución del peso y el índice de masa corporal de los pacientes con EH. Se ha demostrado que el déficit de peso es un signo independiente de la cantidad de corea presente, pero su manifestación se evidencia en sujetos pre-EH debido a un desequilibrio que estos pueden tener en el uso de la energía, por lo que es factible considerarlo como un proceso primario de la enfermedad. (8)

3.2- Epidemiología del Huntington.

La frecuencia poblacional de enfermedades monogénicas como es el caso de la EH depende principalmente de su modo de herencia, tasa de mutación y aptitud reproductiva. Otros factores están definidos por característica de la población tales como la migración, la endogamia, el apareamiento variado y el tamaño de la población. (6) A nivel global la EH se describe con una prevalencia de 5 a 10 por 100.000 habitantes, pero con una tendencia geográfica bastante marcada. (10) En cuanto a este último punto, existen estudios de

prevalencia mundial de la EH que pueden ampliar el panorama y se mencionan a continuación.

Se ha encontrado que existe una variación de más de diez veces entre las distintas regiones geográficas. Las tasas de prevalencia en el continente africano son muy bajas (Sudáfrica 0.02-0.05 por 100,000 y Zimbawe 0.48–1.84 por 100,000). En América del Norte, autores como Folstein reportan una prevalencia entre la población afrodescendiente de 6.37 por 100,000 y en blancos de 4,79 por 100,000. En países asiáticos como Japón, Hong Kong, Corea del Sur y Taiwán la prevalencia fue de 0,42 por 100.000. En cuanto a las poblaciones caucásica de lugares como Australia, Europa Occidental incluyendo el Reino Unido y América del Norte, la tasa de prevalencia fue de 9.71 por 100,000. (11) En Latinoamérica la enfermedad de Huntington muestra una sorprendente tendencia geográfica en el Oeste de la Costa del lago Maracaibo, estado Zulia, Venezuela con una tasa de 700 por 100.000 habitantes. (1) Además de esto según una revisión sistemática de la EH realizada en el continente por Castilhos et al. (12) pacientes de países como Brasil y Venezuela presentaron haplotipos similares a los observados en Europa sugiriendo un origen ancestral caucásico. No así pacientes de Perú, donde además del Haplogrupo A ligado al cromosoma con la mutación más frecuentemente encontrado en caucásicos, se encontró la presencia en un 15% de pacientes del Haplogrupo C lo que sugiere un origen amerindio en esos afectados. Finalmente, en lo que respecta a Chile, la situación es similar a la de Norteamérica, con números que van de los 4 a 8 casos por cada 100.000 habitantes según el estudio realizado por Cruz Cocke en los años noventa. (8)

La distribución es homogénea entre hombres y mujeres a lo largo del mundo, no hay evidencias de que la mutación tenga una preponderancia por género para presentarse. Los estudios genealógicos afirman que el origen de la EH se encuentra en el Oeste de Europa, específicamente en Francia, Alemania y Holanda, con posterior extensión hacia Inglaterra, Sudáfrica, Australia y el continente americano. (5)

3.3- Manifestaciones clínicas.

La enfermedad de Huntington se caracteriza clínicamente por afectación de tres áreas fundamentales: motora, psiquiátrica y cognitiva. Desde el punto de vista motor, las principales características son los movimientos involuntarios tipo corea (movimientos irregulares, repetitivos, breves) en boca, manos, pies, cabeza y tronco, que pueden iniciarse como pequeños tics en una extremidad o cara de forma intermitente hasta generalizarse y hacerse más frecuentes; deterioro en movimientos voluntarios con torpeza motora, enlentecimiento de movimientos o bradicinesia, distonía y finalmente rigidez, asimismo ataxia, disartria, impersistencia motora, disfagia, alteraciones de los movimientos oculares, del equilibrio y de la marcha con pérdida progresiva de la deambulaci3n. Dentro de las manifestaciones psiquiátricas podemos encontrar depresi3n, cambios en la personalidad, ansiedad, apatía, ideaci3n suicida, trastornos psic3ticos entre otros. Otro aspecto importante es el deterioro cognitivo progresivo que evoluciona a demencia subcortical, con alteraciones de memoria, de funciones ejecutivas y atenci3n, entre otras.

Otras manifestaciones clínicas que pueden ocurrir son: p3rdida de peso asociada a alteraciones en metabolismo energ3tico, a pesar de la hiperfagia que suele caracterizar a estos pacientes; hipotonía: las personas con EH experimentan una brusca p3rdida del tono muscular, que con el tiempo las lleva a depender de instrumentos de apoyo para mantenerse de pie conduciendo finalmente a p3rdida de la deambulaci3n; cefalea: de intensidad moderada a severa y que suele iniciarse en las zonas occipito-cervical para luego pasar a la frontotemporal o viceversa, avanzando finalmente hasta generalizarse; trastornos urinarios tipo incontinencia urinaria sobre todo en estadios más avanzados; narcolepsia: los individuos afectados pueden quedarse dormidos repentinamente a cualquier hora del día; despertar psicomotor tardío con desasosiego y trastornos de la libido: con aumento o disminuci3n de la misma. (13)

Las manifestaciones clínicas de la EH tienen una edad de inicio que oscila entre la cuarta y la quinta d3cada de vida, pero no es el único momento en el que estas se presentan, pudiendo

distinguirse cuatro formas en base a la clasificación etaria. Alrededor de un 10% de casos ocurren en una etapa infantil donde las alteraciones patológicas son visibles antes cerca de los 10 años, también una forma juvenil de inicio anterior a los 20 años.(14) Finalmente, la manifestación adulta o clásica que se encuentra en mayor proporción, que es precisamente la descripción de un paciente promedio (ver figura 1). A lo ya mencionado se puede agregar otro estado clínico, conocido como la forma tardía; ocurre después de los 55 años de edad, pudiéndose observar corea pura y ausencia de deterioro intelectual, con una presentación, en general, más lenta.

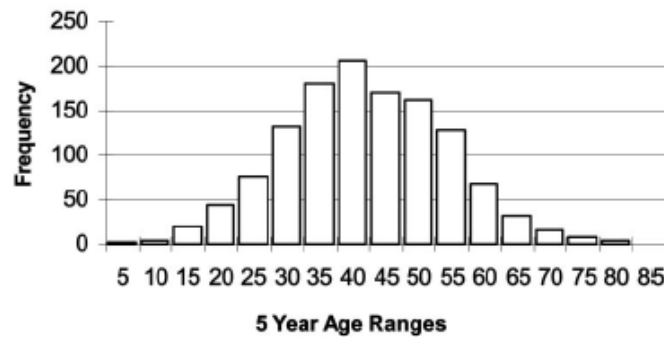


Figura 1: Grafica de la frecuencia en la que se presenta la EH según la edad. (Myers, 2004)

Un factor que incide en la edad de aparición de las primeras manifestaciones clínicas es la cantidad de replicaciones de CAG que puedan existir de en una misma persona, ya que, a mayor número de repeticiones, más temprano inicia la enfermedad; por lo que una prueba genética es clave para desarrollar en mayor profundidad este tipo de correlaciones. (15)

En la enfermedad de Huntington, de acuerdo con su evolución (la cual puede ser variable entre un individuo y otro incluso dentro de una misma familia) es posible diferenciar varios estadios. Para realizar esta clasificación se toma en cuenta principalmente el aspecto motor (16) En la literatura que hace referencia a este punto se encuentra la escala de Fahn-Marsden (Burke et, al., 1985) en la que se estratifica la severidad respecto a las alteraciones del habla, la deglución, movimiento de ojos, alteraciones motoras en boca, cuello, brazo, tronco, pierna, alimentación, higiene el caminar, ente otros. A cada uno de estos se les da una puntuación de 0 a 4, generando cinco estadios, donde el 0 para todos los casos significa normal o ausencia

de algún movimiento errático, mientras que el valor 4 hace referencia a un daño severo. (16) Esta escala es de alto valor diagnóstico, especialmente en la elección de un tratamiento para el paciente según su condición. Si se quisiera hacer un análisis más integro en el que se contemple además del ámbito motor, la función neurológica de un paciente, se tiene la escala de calificación de capacidad funcional de Shoulson-Fahn de 1979, que mide la independencia en actividades diarias como comer, vestirse y administrar las finanzas personales, y se utiliza para estadificar la enfermedad y seguir su progresión. Al respecto se han llevado a cabo múltiples estudios de correlación entre la discapacidad temprana de un individuo y la manera en que este desarrolla la enfermedad usando precisamente este método como herramienta de evaluación. (17) Sus autores distinguen cinco estadios, con cuatro parámetros cada uno como los ya mencionados, siendo organizados de forma ascendente en cuanto a incapacidad funcional.

Por otro lado, autores como Walker et al. (18), describe cuatro estadios de forma transversal en pacientes con EH. Aquí hace una relación del ciclo de vida completo incluyendo no solo los aspectos motores, sino que también la implicancia genética y la condición neuropatológica de acuerdo al estadio correspondiente, por lo general las causas más frecuentes de muerte son la neumonía posterior encamamiento prolongado, asfixia por broncoaspiración debido a los problemas de deglución, y el suicidio (ver figura 2).

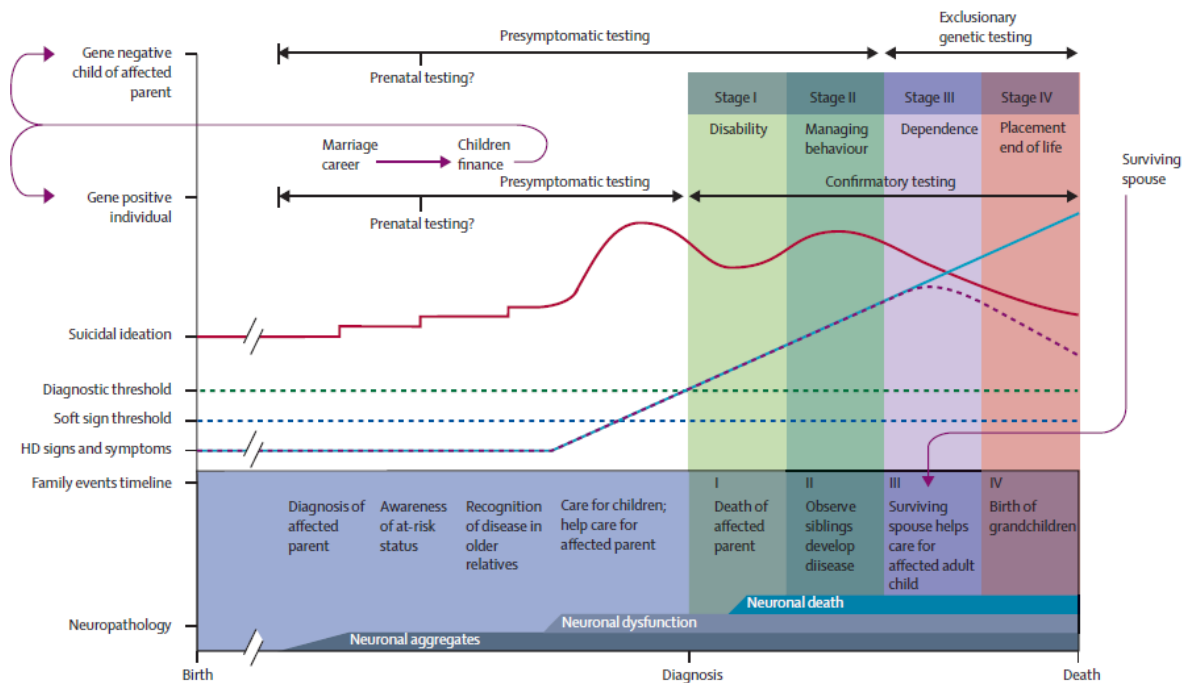


Figura 2: Ciclo de vida en la enfermedad de Huntington (Walker, 2007)

La figura 2 describe la evolución secuencial de los de la EH y, en última instancia, la naturaleza recurrente de la enfermedad de Huntington desde la perspectiva de un niño nacido de un padre afectado. La cronología de los eventos familiares muestra los sucesos que pueden ocurrir en diferentes secuencias para diferentes individuos; independientemente de si hay una sincronización o no. Dichos eventos pueden tener implicancias clínicamente significativas. (18)

3.4- Fisiopatología de la Corea en la Enfermedad de Huntington.

La corea es la alteración característica del movimiento en la enfermedad de Huntington. Resulta de la disfunción generada dentro de un complejo de red neuronal que se encuentra interconectando áreas corticales motoras con un grupo de núcleos subcorticales denominados

colectivamente ganglios basales. Estos últimos incluyen el núcleo caudado, putamen, segmentos externos e internos del globo pálido (GPe y GPi), junto con estructuras asociadas como el núcleo subtalámico y la sustancia negra. (19)

Para poder comprender el origen de esta manifestación es necesario ampliar el panorama de la morfofisiología implicada (ver figura 3). Al respecto se describe una relación directa con la degeneración de los ganglios basales antes mencionados, los cuales están constituidos por el cuerpo estriado y el núcleo amigdalóide. La sustancia negra (SN) y el núcleo subtalámico (NST) también se incluyen dentro de los ganglios basales, debido a sus conexiones con los núcleos anteriores. El cuerpo estriado comprende el neostriado (NC y putamen) y el paleostriado o globo pálido (GP). Este último se divide en externo (GPe) e interno (GPi). Las proyecciones de la corteza y de la SNc terminan principalmente en el caudado-putamen. La información del caudado-putamen se dirige al GPi/SNr a través de 2 vías: una directa monosináptica y una indirecta que pasa a través del GPe y el NST. La liberación de dopamina de los terminales nigroestriados parece tener acción moduladora en la actividad de las vías directa e indirecta. La transmisión es facilitada por los receptores D1 en la vía directa e inhibida por los receptores D2 en la indirecta. El efecto final de la liberación estriatal de la dopamina es una reducción de la actividad de las conexiones de salida de los ganglios basales, lo que conduce a una hiperactividad de las neuronas de proyección tálamo-corticales. Según este modelo, la estimulación de la vía directa produce una reducción en la actividad de las conexiones de salida de los ganglios basales causando una desinhibición de las neuronas tálamo-corticales y facilitación del movimiento. Por el contrario, la activación de la vía indirecta conduciría a un incremento en la actividad de las conexiones de salida de los ganglios basales y la supresión del movimiento. Precisamente la EH se caracteriza por un descenso en la actividad de las conexiones de salida de los ganglios basales. Teniendo en cuenta todo lo mencionado, se afirma entonces que el mecanismo de producción de los movimientos coreicos sería el siguiente: la degeneración de las neuronas estriatales que se proyectan al GPe (vía indirecta) produciría una desinhibición del GPe, seguida de un aumento de la inhibición del NST y, como consecuencia, una reducción de la actividad del GPi y de la conexión de salida hacia el tálamo. La desinhibición del tálamo originaría una hiperactividad de la vía tálamo-cortical y la aparición de los movimientos coreicos. (20)

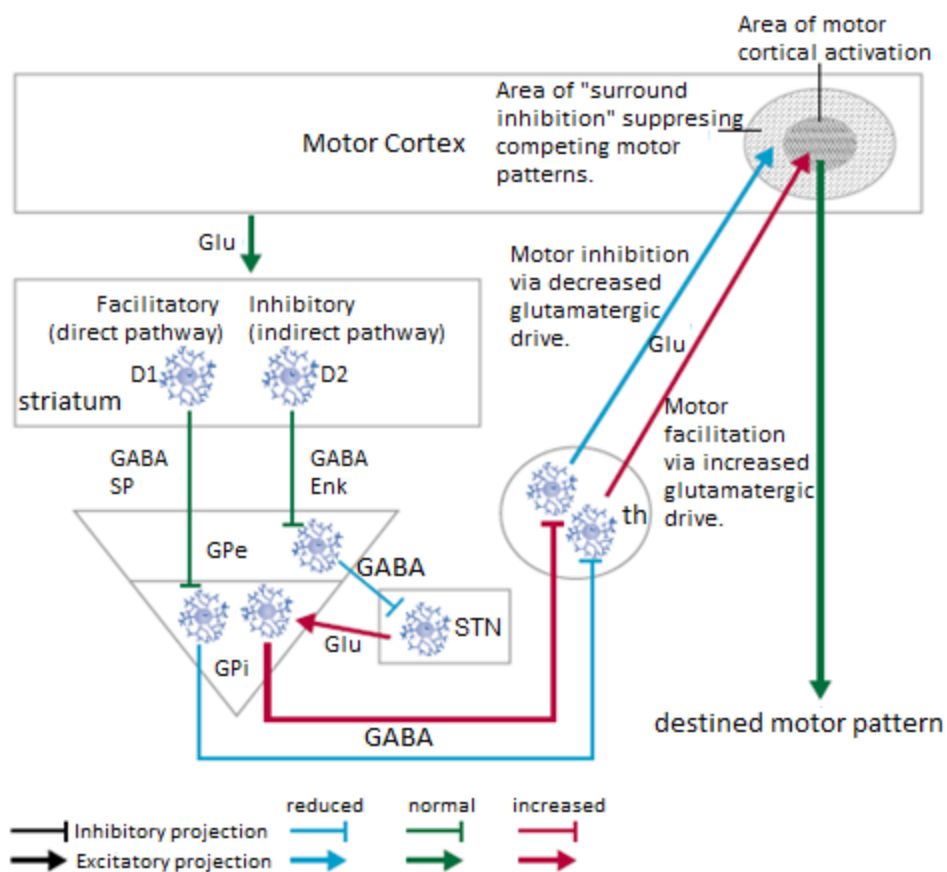


Figura 3: Esquema de las vías de señalización alteradas en la EH (Cardoso, 2006).

Glu = glutamato; SP = sustancia p; Enk = encefalina; STN = núcleo subtalámico; Th = tálamo.

Las vías de salida estriato-palido-talámicas que facilitan (a través de la vía directa) o inhiben (a través de la vía indirecta) la actividad motora cortical. La modulación se logra mediante diferentes niveles de actividad de las proyecciones inhibitorias GABAérgicas del GPi al núcleo motor del tálamo. Una desinhibición cortical motora neta conducen a un mayor impulso motor tálamo-cortical con aumento de la activación cortical motora produciendo corea. (19)

3.5- Trastornos neuropatológicos.

Las alteraciones neuropatológicas en la EH son muy selectivas, con pérdida importante de células y atrofia de los núcleos caudado y putamen que como es sabido juegan un rol fundamental en la fisiopatología de la enfermedad; Investigadores como Vonsattel et al. (21) De forma más detallada, describen la patología afirmando que el 80% de los cerebros de pacientes con EH presenta atrofia de los lóbulos frontales, si se examina macroscópicamente la sección coronal revela atrofia simétrica bilateral del cuerpo estriado en el 95% de los cerebros con EH. Esta atrofia del estriado es prominente en 80% leve en 15%, y sutil en 5% de los casos. En cuanto al tamaño cerebral Vonsattel menciona que, como regla general, el cerebro es difusamente más pequeño de lo normal en la etapa tardía de la enfermedad.

Los daños ya mencionados son considerados como los principales desencadenantes de trastornos psiquiátricos conductuales, que, como se mencionó en un principio pueden constituir el primer síntoma. Estos se caracterizan por: cambios en la personalidad, cuadros depresivos, paranoia, alucinaciones, agitación, apatía, disminución de la libido, inatención para seguir una conversación, descuido del aseo personal, etc. Como es de esperarse, el área cognitiva también se ve muy deteriorada dejando ver fallas en la memoria a corto plazo y alteración del juicio; su cúspide se alcanza con el desarrollo de la demencia que incapacita ampliamente a los afectados. Esta es de tipo subcortical, donde principalmente se puede detectar lentitud en el pensamiento. (13)

Un alto número de repeticiones del trinucleotido CAG no solo se relaciona a la premura con la que se presentará la enfermedad en un individuo, sino que además existe una correlación entre esta carga genética y el grado de severidad neuropatológica. Un alto número de repeticiones de CAG se corresponde con una pérdida neuronal también mucho más acentuada. (20)

3.6 Aspectos genéticos moleculares: Gen de la Huntingtina (*HTT*).

El gen *HTT* está directamente vinculado a la enfermedad de Huntington, la expansión del trinucleótido CAG en el exón 1 se traduce en una proteína Huntingtina inestable y anómala con cola de poliglutamina. El gen *HTT* se encuentra en el cromosoma 4 humano, específicamente en la ubicación 4p16.3, muy cercano al telómero del brazo corto del cromosoma. Esta región es de aproximadamente 1000 Kb y tiene un contenido génico potencial de unos 5000 genes de los cuales se sospecha que 27 están relacionados con enfermedades. (22) El locus donde se aloja es grande, abarca 180 kb y consta de 67 exones. Se expresa de dos formas poliadeniladas con abundancia relativa en diversos tejidos fetales y adultos. El transcrito mayor es de aproximadamente 13.7 kb y se expresa predominantemente en el cerebro adulto y fetal, mientras que el más pequeño de aproximadamente 10.3 kb se expresa más ampliamente por otros tejidos. Este gen contiene un marco de lectura abierto en sentido ascendente en la UTR 5' que inhibe la expresión del producto génico de la huntingtina a través de la represión de la traducción. pero puede conferir una nueva propiedad al ARNm o alterar la función de la proteína. (23)

3.7- Diagnóstico para la enfermedad de Huntington.

Actualmente las patologías de tipo neurodegenerativo, en general, tienen un gran impacto a nivel mundial, ya que reúnen una serie de características que las hacen ser altamente insidiosas. En primer lugar, la incapacidad de generar un diagnóstico oportuno limita las acciones clínicas para con los pacientes. Esto ocurre en gran medida debido a que cuando hay manifestaciones tempranas como trastornos del movimiento, ataxia, entre otras, suelen superponerse con una serie de signos similares que retrasan el proceso. Aunque el diagnóstico de la EH se puede sospechar de acuerdo a la presencia de manifestaciones clínicas características y en la historia familiar, el mismo debe ser confirmado mediante la detección de la mutación con la prueba genética correspondiente.

Si bien, actualmente no existen prácticas para prevenir la aparición o generar la cura de una de estas enfermedades, el diagnóstico temprano y preciso favorece al momento planificar las decisiones, estilos de vida y cuidados que el afectado requerirá. Lo que, por supuesto va en pos de la mejor calidad de vida posible una vez que se está inmerso en esa situación. De igual forma, un diagnóstico confirmado tempranamente permite ofrecer un adecuado asesoramiento genético al afectado y familiares en riesgo, y aunque en la actualidad el tratamiento para la EH es sólo sintomático y no modifica el curso de la enfermedad, los avances actuales en la terapia génica de la EH permiten predecir que en un futuro podría iniciarse este tipo de tratamiento años antes de que los síntomas inicien, cobrando mucha más relevancia la detección de la mutación y el diagnóstico precoz.

Gusella y colaboradores fueron quienes identificaron por primera vez el locus en 1983, para posteriormente clonar el gen que codifica para la proteína huntingtina en el año 1993. (24) Logrando relacionar la mutación específica con la enfermedad de Huntington. En otras palabras, descubrieron que un aumento en las repeticiones del trinucleótido CAG en el exón 1 del gen *HTT* (conocido como *IT15* en esa época) era el causante del conjunto de manifestaciones clínicas observadas en los afectados con EH. Este importante hallazgo, además de tener una utilidad inmediata para la confirmación del diagnóstico en presencia de manifestaciones clínicas, permitió detectar la mutación aún en familiares a riesgo que no tenían síntomas (diagnóstico predictivo o presintomático) y posteriormente prenatal e incluso preimplantacional.

Desde el punto de vista del tamaño de la expansión, un individuo con 40 o más repeticiones CAG va a presentar penetrancia completa, y sus hijos tendrán un 50% de probabilidades de heredar la EH. Por otro lado, un número menor a 27 repeticiones implica un riesgo nulo de desarrollar la EH y se considera un fenotipo normal, sin riesgo para su descendencia. Entre 27 y 35 repeticiones se denominan alelos intermedios, en este caso no hay manifestaciones clínicas en el sujeto portador, pero cuando éste es de género masculino, ocurre una tendencia a mayor inestabilidad meiótica, por lo que el número de repeticiones

podría expandirse en sus gametos y por ende en su descendencia y pasar al de rango de penetrancia reducida o completa y aumentando así considerablemente el riesgo de tener hijos afectados con EH. La última subclasificación va de 36 a 39 repeticiones denominándose alelos con penetrancia reducida, pudiendo o no desarrollar la enfermedad en el transcurso de su vida (ver figura 4) y, al igual que en el caso anterior sus hijos tendrían también un riesgo de estar afectados también. (25)

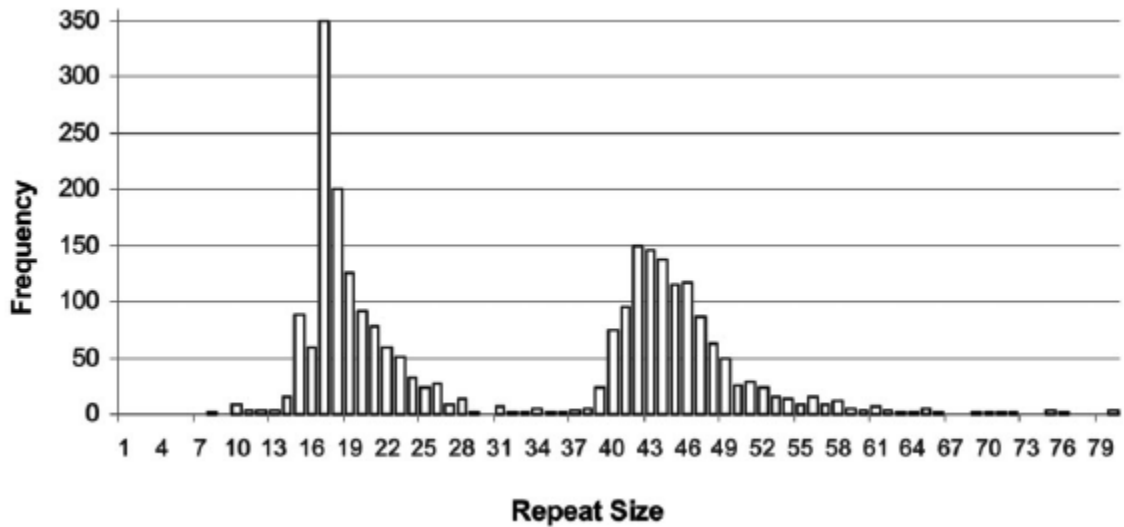


Figura 4: Frecuencia de repeticiones de CAG normal y expandido. (Myers, 2004)

Las repeticiones de 40 o más están asociadas con la expresión de EH. Las personas que llevan repeticiones en este rango desarrollarán EH, asumiendo que no mueren por otras causas antes de su aparición.

El diagnóstico se basa principalmente en las manifestaciones clínicas (siendo la corea el signo más orientador) y antecedentes familiares del paciente. Para esto se debe tener información sobre antecedentes hereditarios, que la aparición sea generalmente en etapa adulta, que se observe una evolución crónica progresiva, trastornos mentales, crisis hipotónicas, cefalea, trastornos del sueño, trastornos demenciales y el fatal empeoramiento del afectado. Una vez cumplido lo anterior y teniendo como base que en patologías extrapiramidales hay dos grandes síndromes principales, el clínico trata de descartar e investigar más en profundidad según corresponda.

Por un lado, un síndrome hipokinético hipertónico que hace alusión a Parkinson, abarcando a pacientes con poco movimiento y un tono muscular elevado. Todo lo contrario, a individuos coreicos. Y, por otro lado, el síndrome hiperkinético distónico donde hay mayor movimiento corporal y alteraciones del tono muscular. En este caso si hay coincidencia, pudiendo tratarse de corea o atetosis. Para poder discriminar finalmente entre una y otra es que se evalúa el cuadro de hiperkinesia, puesto que una motilidad involuntaria tan anárquica y violenta que llegue a comprometer miembros y segmentos corporales enteros, no podría ser sino clásica de una persona con EH. (26) De igual manera, la enfermedad de Huntington termina con un cuadro de hipokinesia y rigidez por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía directa en su fase más avanzada.

Finalmente, otras pruebas como la neuroimagen pueden apoyar el diagnóstico con el fin de descartar otras condiciones, pero habitualmente no son necesarias, más aún si hay una presentación característica de un individuo con una historia familiar conocida y una prueba genética positiva. Sin embargo, si una resonancia magnética o tomografía computarizada muestra simetría en la atrofia del estriado en ausencia de otros cambios sustanciales, puede ser fuertemente sugerente de un diagnóstico de la enfermedad de Huntington (ver figura 5), con cambios visibles incluso antes del "inicio motor". (27)

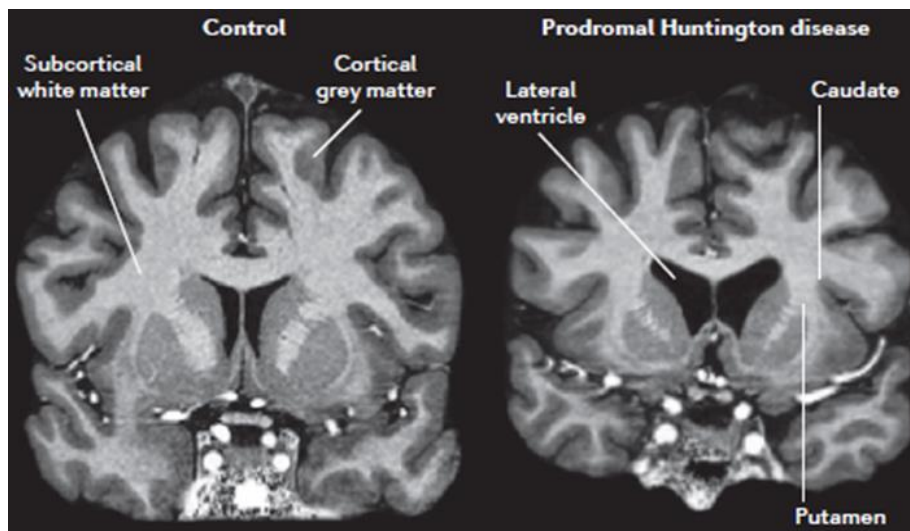


Figura 5: Atrofia prodrómica mostrada mediante RMN. (Bates, 2015)

Se compara una imagen de cerebro normal (izquierda) con cerebro de paciente con EH en fase prodrómica (derecha), donde se observa atrofia de núcleos, caudado, putamen y ventrículos laterales ensanchados. Atrofia bilateral del caudado y putamen, con un aumento concomitante en el tamaño del ventrículo lateral lleno de líquido, observable en el portador del gen en comparación con el control.

Al tener toda la información ya mencionada sobre el diagnóstico de la EH, en Chile se han establecido criterios clínicos impartidos por el ministerio de salud (MINSAL) en base a guías clínicas internacionales y adecuadas a la realidad nacional. Estos criterios toman en cuenta tópicos como: síntomas neuropsiquiátricos y cognitivos compatibles, donde se evalúan los trastornos del ánimo, manía de conducta obsesiva, compulsiva, alucinaciones, síndrome disejecutivo, apatía, irritabilidad. (28) En cuanto al ámbito molecular se toma en consideración la prueba genética para cuantificar el número de repetición de CAG del exón 1 del gen *HTT*. Este resultado debe ir relacionado además con trastorno del movimiento hiperkinético, específicamente corea, ataxia, distonía, mioclonías. Por último, la evaluación de la historia familiar toma bastante peso, más aún cuando se trata de pruebas presintomáticas. La clasificación de los pacientes según su estado se facilita gracias al uso de la escala de funcionalidad y a la escala unificada de valoración de la Enfermedad de Huntington (UHDRS). (28) Presentes en el protocolo del MINSAL vigentes a partir del 1 de julio del 2019.

3.8- Protocolo de evaluación y consejería genéticas para la Enfermedad de Huntington.

Antes de llevar a cabo cualquier prueba genética es necesario tener jornadas informativas que pueden guiar en distintos aspectos del proceso al paciente involucrado. Los objetivos del

asesoramiento son: Informar al individuo de sus opciones sobre pruebas u otras alternativas, dependiendo de las circunstancias personales para garantizar que él está consciente de los riesgos y posibles consecuencias adversas, informar sobre las limitaciones y nivel de exactitud del procedimiento. Debe quedar en claro que el asesoramiento no trata de excluir o desalentar a las personas, sino que trata de asegurar que el individuo esté informando al momento de la elección. Varios protocolos utilizados según consenso incluyen dos sesiones de asesoría, examen neurológico y la entrega en persona de resultados de la prueba. La información sobre la historia familiar de la persona es reunida para confirmar la presencia de la EH en la familia y también para evaluar el estado de riesgo actual de la persona. En cuanto a la prueba predictiva, muchos programas incluyen una evaluación neurológica como parte de la evaluación pretest. Muchas personas en riesgo buscan las pruebas genéticas preocupados por haber exhibido síntomas de EH o por su riesgo debido a antecedente familiar. Por lo tanto, la evaluación neurológica responderá a la pregunta de si el individuo tiene síntomas de la enfermedad, sin embargo, un porcentaje importante de las personas a riesgo y que no presentan los síntomas deciden posponer o no realizarse nunca la prueba genética. Para aquellas personas que pueden ser sintomáticas y que pueden ser diagnosticadas en el curso de la evaluación de la prueba genética, es importante reconocer que la prueba ya no es presintomática y luego iniciar un tratamiento asociado con el inicio de la enfermedad. (15)

Para las pruebas de diagnóstico prenatal y diagnóstico genético preimplantacional, estas deben ser solicitadas por un genetista clínico. El método de prueba es idéntico a la prueba presintomática con algunas excepciones. Esta puede ser una opción valiosa para las parejas que desean evitar transmitir la enfermedad sin revelar su propio estado o para evitar la interrupción de un embarazo, pero solo se ofrece en un número limitado de centros especializados. (23)

En general, la realización de pruebas de diagnóstico genético tiene algunos procesos en común independientemente del tipo de prueba y del tejido de origen, como lo son el aislamiento o extracción del ADN, la reacción en cadena de la polimerasa y métodos específicos de caracterización de mutaciones.

3.9- Extracción de ADN para la PCR.

Antes de realizar la reacción en cadena de la polimerasa, previamente se debe extraer el ADN del tejido original. Uno de los tejidos más utilizados hace referencia a muestras de sangre periférica con anticoagulante. Existen distintos métodos para obtener ADN de alta pureza y calidad. Entre estos se encuentran: la extracción con disolventes orgánicos, con isotiocianato de guanidina, extracción por Trizol, técnica por shock, extracción inorgánica por salting out, cuentas magnéticas, entre otros. (29)

Algunos de los principales pasos utilizados en la extracción con disolventes orgánicos son: 1) lisis celular realizada mediante la adición de una solución que contiene detergente / caotrópico, que incluye SDS o N-Lauroyl sarcosine; 2) inactivación de las DNAsas y RNAsas, generalmente mediante el uso de disolventes orgánicos; 3) purificación de ADN y eliminación de ARN, lípidos y proteínas; y 4) resuspensión de ácidos nucleicos extraídos. (30) En 1988, Miller et al. (31) publicaron un protocolo que logró la purificación del ADN mediante la precipitación de proteínas a altas concentraciones de sal. El protocolo tradicional involucra la interrupción celular inicial y la digestión con SDS-proteinasa K, seguida de la adición de altas concentraciones de sales, generalmente cloruro de sodio 6M. Luego, la mezcla se centrifuga para permitir que las proteínas precipiten al fondo, con el sobrenadante que contiene el ADN y es transferido a un nuevo vial. El ADN se precipita utilizando etanol o isopropanol de la misma manera que se describe para los métodos con solventes orgánicos. Otro protocolo es el método modificado de salting out publicado en 2005 por Nasiri et al. (32) que reemplazó la digestión con proteinasa K con el uso de polvo de lavandería. Esta técnica modificada se ha utilizado con éxito como protocolo de extracción de ADN. Los métodos de extracción en fase sólida para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre

fueron descritos inicialmente en 1989 por McCormick, quien publicó una técnica que utiliza partículas insolubles basadas en silicio, químicamente similares al fenol, que interactúan con las proteínas para permitir la purificación del ADN. Desde entonces, se han desarrollado varios procedimientos diferentes que utilizan el enfoque de extracción de ADN líquido / sólido y se utilizan en la mayoría de los kits de extracción disponibles comercialmente. (30) Otro método útil es el de las matrices de sílice, las que tienen propiedades únicas para la unión al ADN. Están cargadas positivamente y tienen una alta afinidad con la carga negativa del ADN. Las altas condiciones salinas y el pH se logran utilizando cationes de sodio, que se unen fuertemente al oxígeno cargado negativamente en el fosfato del ADN. Los contaminantes se eliminan con una serie de pasos de lavado, seguidos de la elución del ADN con baja fuerza iónica ($\text{pH} \geq 7$) utilizando tampón TE o agua destilada estéril. (30)

3.10- Reacción en cadena de la polimerasa. (PCR, polymerase chain reaction)

La primera vez que se describió un método enzimático para la replicación de una pequeña secuencia de ADN con iniciadores *in vitro* fue en 1971, en un artículo publicado por Kleppe et al. en *Journal of Molecular Biology*. Sin embargo, este temprano ejemplo del principio básico de la PCR no recibió mayor reconocimiento, y no fue sino hasta 1983 donde se volvió a hablar de una técnica similar, derechamente con la invención de la reacción en cadena de la polimerasa, generalmente atribuida a Kary Mullis. Mullis ganó el Premio Nobel por su trabajo en PCR. (33)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es sin duda una de las técnicas más importantes de la biología molecular. Su principal particularidad se sustenta en el hecho de sintetizar muchas copias de ADN a partir de un fragmento inicial muy pequeño. La enzima encargada de este proceso es una polimerasa proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*, esta puede trabajar a altas temperaturas (79°C a 85°C). El objetivo de llevar a cabo esta reacción es simular lo que pasa en la célula cuando sintetiza ADN. Por lo tanto, para hacerlo *in vitro* es necesario mezclar una serie de ingredientes que aseguren el éxito del

procedimiento. En primer lugar, debe estar la enzima antes mencionada que se encarga de generar la replicación utilizando una hebra como molde para complementarla con los dinucleótidos (dNTPs), el ADN del organismo que se desea estudiar donde se encuentra el segmento a amplificar, los oligonucleótidos o primers que son un aproximado de 15 a 30 nucleótidos que flanquean el sitio donde comienza y termina la acción de la *Taq* polimerasa. De estos se debe tener uno en el sentido de la hebra original (forward) de 5' a 3' y otro anti sentido (reverse) dejando un extremo 3' libre para facilitar la transcripción. Los dNTPs son la materia prima que utiliza la enzima para hacer posible la amplificación, el magnesio cumple un rol de cofactor en el sitio activo de la polimerasa y se adiciona como una sal de cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Finalmente, el medio debe mantener un pH óptimo el cual es otorgado por una solución amortiguadora que es capaz de darle estabilidad de cargas. (34)

La reacción como tal se lleva a cabo en el termociclador, el que utiliza el efecto Peltier para generar un bloque de resistencia eléctrica que distribuye una temperatura homogénea a toda la placa con las muestras. Esta es reprogramable gracias al sistema operativo, que además facilita la edición tanto del número de ciclos a realizar como el tiempo de duración de cada etapa. La muestra en primera instancia es sometida a una desnaturalización, donde se separa la doble hebra del ADN a 94°C, rompiendo los puentes de hidrogeno que las mantenían unidas y, por lo tanto, dejando disponibles dos hebras simples como molde. Luego de esto la hay un descenso hasta un rango que puede ir de los 40°C a los 60°C favoreciendo la alineación de los iniciadores a sitios específicos para los que fueron diseñados previamente. La unión a las cadenas simples se da por complementariedad de bases. Finalmente, la temperatura debe elevarse hasta 72°C para optimizar la actividad de la enzima, la que se une al ADN junto a los iniciadores para comenzar la replicación siempre en sentido de 5' a 3'. Estas etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión del material genético se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias; comúnmente se utilizan 35 ciclos para amplificar el fragmento que se requiere. (35)

Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado.

3.11- Aplicaciones de la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa tiene varias aplicaciones de gran utilidad en el ámbito de la biología molecular. Esta técnica es el método de elección para clonar fragmentos de ADN que son especialmente reducidos de tamaño, (secuencias menores a 10.000 pares de nucleótidos) y que pueden ser de utilidad para la identificación de mutaciones para el diagnóstico de enfermedades específicas. Tiene la ventaja de que el molde original puede ser tanto ADN como ARN. Obteniéndose una copia genómica completa o una copia de ADN complementario (cDNA) respectivamente. Otra aplicación se sustenta gracias a su elevada sensibilidad que permite detectar infecciones producidas por patógenos en estadios tanto tempranos como tardíos. En este caso se utilizan secuencias cortas complementarias para el genoma del patógeno como cebadores y luego de los ciclos de amplificación se determina la presencia o ausencia del genoma invasor en una muestra de sangre. Actualmente esta técnica puede reemplazar el uso de anticuerpos contra proteínas de superficie. Por último, la PCR tiene un rol fundamental también en la medicina forense, ya que es necesario el uso de mínimas trazas de muestras biológicas para obtener resultados. Y si se usan grupos de iniciadores que abarquen las secuencias conocidas altamente variables del genoma humano es posible generar un perfil genético de ADN para identificar a cada individuo. (36)

3.12- Medidas para optimizar la PCR.

La optimización de la técnica PCR depende de una serie de factores, los que en su mayoría pueden ser estandarizados, pero para esto es necesario conocerlos y saber exactamente en qué etapa de la reacción y de qué forma pueden interferir. Esterilizar el material que se va a utilizar (para aplicaciones muy sensibles a la contaminación se recomienda emplear puntas

con filtro), etiquetar reactivos con nombre, fecha de preparación, concentración y nombre del usuario, determinar las condiciones de la PCR basados en la enzima polimerasa que se utilice, el tamaño del fragmento y la temperatura de alineamiento de los iniciadores (también denominado T_m , por las siglas en inglés de melting temperature), limpiar el área de trabajo con cloro 10%, hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N o etanol 70%. Estas son algunas de las medidas básicas para una reacción satisfactoria. En cuanto a los reactivos todos deben ser descongelados en baño de hielo y mezclados perfectamente ya que son sensibles a la temperatura. Únicamente la enzima se mantiene en el congelador hasta el momento de usarse para prevenir su degradación, y está lista para usarse inmediatamente dado que por su dilución en glicerol no se congela a -20°C . En lo que respecta al termociclador antes mencionado, es necesario determinar el ramping (tiempo que tarda el equipo en cambiar de una temperatura a otra). Lo ideal es que este cambio lo realice lo más rápido posible ($3-4^{\circ}\text{C}/\text{seg.}$), pero dicha característica está sujeta a la capacidad de cada equipo en cuestión.

Es necesario asegurarse de tener áreas exclusivas para extracción de ADN, PCR y electroforesis, hacer alícuotas de todos los reactivos facilita la resolución de problemas frente a alguna contaminación o hidrólisis, ya que de ocurrir esto se puede tomar una nueva alícuota. Por último, el valor analítico a la técnica está dado por los controles de la misma. Se debe utilizar siempre un control negativo que contenga todos los reactivos menos el ADN molde para poder monitorear posibles contaminaciones. También es recomendable usar un control positivo, que consiste en una muestra que amplificará sin problemas bajo las condiciones establecidas. Asegurándose de que las soluciones utilizadas se encuentran en las condiciones apropiadas. (35)

Hoy existen múltiples variantes de PCR que han ido perfeccionando la técnica en cuanto a especificidad, automatización, cuantificación, sensibilidad, etc; sin embargo, los fundamentos son los mismos para todas.

3.13- Sensibilidad y especificidad de la técnica.

Para evaluar el desempeño, la calidad o lo certera que puede ser una prueba diagnóstica, se ha definido una serie de parámetros a cumplir acordes con las características que esta posea. Las dos propiedades más conocidas son la sensibilidad y la especificidad. La primera es la probabilidad de que la prueba clasifique correctamente a los enfermos o, dicho de otro modo, la probabilidad de que el enfermo sea positivo; numéricamente se puede obtener dividiendo los verdaderos positivos por el número total de enfermos. Por otra parte, la especificidad se entiende como la probabilidad de que se clasifique correctamente a los sanos o, en otras palabras, de que los sanos tengan un resultado negativo; y se calcula dividiendo los verdaderos negativos entre el número de sanos. Tanto la sensibilidad como la especificidad son características intrínsecas de la prueba diagnóstica, por ende, van de la mano con la reproducibilidad de la técnica, ya que siempre que se realice en condiciones similares los valores de ambas deberán ser los mismos que los obtenidos en una oportunidad anterior. Es así, que estos conceptos dan una idea de la capacidad de la técnica para discriminar entre sanos y enfermos. Luego se pueden establecer rangos umbrales y decidir en cada caso si se alcanza el grado de certidumbre necesario para la toma de decisiones. (37)

La reacción en cadena de la polimerasa es utilizada para el diagnóstico de la enfermedad de Huntington, ya que permite el análisis directo de los fragmentos generados y posteriormente por electroforesis determinar el número de repeticiones del triplete CAG en el gen *HTT* de los pacientes.

Distintos investigadores han generado a lo largo de los años una serie de protocolos donde detallan la cantidad y la concentración de cada componente para la reacción en cadena de la polimerasa en personas con EH, los que responden en cada caso al más alto nivel de sensibilidad y especificidad posible. Existen leves variaciones entre cada autor y su respectivo experimento, pero son precisamente estas diferencias operacionales en las que se fundamenta el presente trabajo de investigación, llevándose a cabo una revisión exhaustiva para lograr la correcta combinación de los métodos más adecuados. (ver Tabla 7)

Respecto a lo anterior, destaca por ejemplo la elección de los iniciadores, tomando en cuenta la secuencia utilizada en el trabajo de Paradisi, que asegura una alta especificidad para fragmentos con un elevado porcentaje de contenido GC. (38) Para el caso del volumen final de reacción, autores como Tóth et al. (39) optaron por 40 uL, apuntando a que al trabajar con volúmenes mayores el error de manipulación puede ser considerablemente menor. Sin embargo, en este punto se siguió lo descrito por Kremer et al. (2) Ya que al utilizar 25 uL finales permite la homologación de las concentraciones de cada reactivo con los volúmenes a agregar al tubo de reacción. Esta publicación también sirvió de sustento para la elección de la concentración adecuada de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), ya que demostraron que con 2mM de este catalizador enzimático la PCR adquiriría altos niveles de sensibilidad. Para saber con qué concentración de material genético trabajar Majhoubi et al. (40) en su investigación asegura que 100 ng/uL es un valor estándar con el que se obtienen resultados altamente satisfactorios. Esto lo concluye a su vez, basado en trabajos como el de Warner et al. (41) quien generó un gradiente de concentración de ADN entre 50 y 500 ng/uL. Demostrando el impacto en la sensibilidad de la técnica al ir haciendo estas variaciones. Debido a las características ya mencionadas de los fragmentos a amplificar, la mayoría de los autores revisados en la tabla 7 sugerían el uso de un aditivo o potenciador de la *Taq* polimerasa que facilitara el proceso de amplificación. Hormozian et, al. (42) afirma que, para un correcto desempeño de la enzima sobre las cadenas de ADN, la cantidad de aditivo respecto al volumen final de reacción debe ser de un 10%. Teniendo en cuenta esto, y que, además estos autores trabajaron en condiciones similares a las de la presente estandarización, se optó por trabajar con esta relación.

Las condiciones de amplificación también fueron tanteadas con el fin de asegurar la mayor prolijidad posible al momento de observar las bandas en el gel. En este ámbito los protocolos revisados presentaron diferencias considerables que hubo que saber distinguir. Bruland et, al. (43) menciona que con treinta ciclos y una temperatura de alineamiento de iniciadores de 58°C la *Taq* polimerasa amplifica el material genético sin mayor dificultad. Bastante alejado de los treinta y cinco ciclos a una temperatura de 65°C que había aplicado Warner con anterioridad. Pero al investigar un poco más se entiende esta diferencia, puesto que Bruland utiliza otros iniciadores y no hace referencia al uso de algún aditivo para la enzima. Se deduce

entonces, que el reemplazo o la no inclusión de algunos reactivos en la mezcla de reacción, pueden generar cambios compensatorios en las condiciones de amplificación. Finalmente, para este caso se decide tomar lo recomendado por Warner en su investigación de 1993. Si bien la larga data de las afirmaciones científicas de este investigador podría, en algún punto parecer de poca evidencia científica. El hecho de incorporar treinta y cinco ciclos con temperatura de alineamiento para los iniciadores de 65°C al protocolo actual también se sustenta en trabajos más contemporáneos como el de Vásquez et, al. (44) realizado en 2008, donde se desprenden satisfactorios resultados de amplificación con estas últimas condiciones mencionadas.

En la etapa final, donde se debe determinar el tamaño de los fragmentos amplificados también hay alternativas. Para este caso figuran métodos como la electroforesis capilar o la electroforesis en gel de poliacrilamida, las que deben tener una resolución tal que permita discriminar o separar alelos diferentes en una repetición (21). En cualquier caso, es fundamental que se optimice su metodología para conseguir una clara diferenciación de los distintos rangos o categorías alélicas que pueda presentar un individuo. Es, por lo tanto, responsabilidad de cada laboratorio determinar empíricamente sus límites de detección y utilizar adecuados controles internos y externos, tales como marcadores de peso molecular conocido, material clonado de referencia con distintos tamaños de secuencias CAG, muestras normales y expandidas de pacientes previamente analizadas y verificadas de forma independiente; todo con el objetivo de maximizar la sensibilidad y especificidad del proceso.

La presencia de polimorfismos dentro de la propia secuencia de tripletes CAG o su región adyacente puede dar lugar a una cuantificación incorrecta del tamaño de los alelos. El tamaño de la secuencia repetida CCG situada en el extremo 3' de los tripletes CAG puede variar entre 7 y 1226. Por ello los iniciadores antes mencionados no deben incluir aquella región polimórfica. Adicionalmente, hay un pequeño porcentaje de personas que presentan un polimorfismo (deleción del triplete CAA que se encuentra seguido del tracto CAG) que impediría la hibridación del cebador a la secuencia de interés homóloga, dando lugar a un fallo de amplificación y una aparente homocigosidad alélica. Por ello, los resultados de

homocigosis para alelos normales han de interpretarse con precaución y se debe descartar un fallo técnico usando otros iniciadores alternativos. Los errores en la determinación del número de CAG son especialmente relevantes en los casos de alelos en el rango de penetrancia reducida con 36-39 repeticiones (figura 7), ya que puede llevar a graves errores de diagnóstico y en el posterior asesoramiento genético. La separación y análisis del tamaño del segmento CAG puede realizarse mediante técnicas de electroforesis en gel de agarosa, poliacrilamida desnaturalizante o capilar, entendiéndose que cada una de ellas tiene un nivel diferente de especificidad o resolución. Justamente por eventualidades genéticas como las antes mencionadas se ha establecido un margen de incertidumbre según el número de copias que están presente en una persona. Los límites de error aceptados son de ± 1 repetición para alelos menores de 43 repeticiones, de ± 2 para los de 44-50, ± 3 para los de 51-75 y ± 4 para los > 75 . Además de recomendar la realización de PCR y electroforesis capilar dado que proporcionan una mayor sensibilidad o resolución para estimar el tamaño de la secuencia CAG y, por tanto, una mayor fiabilidad diagnóstica. (45)

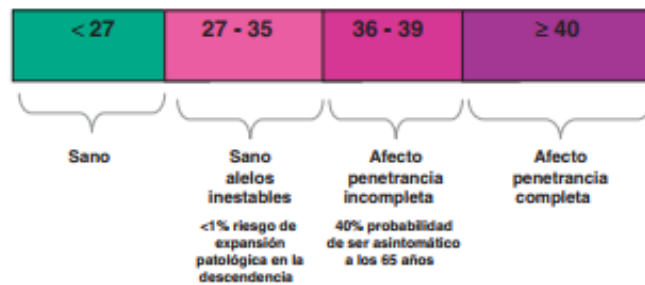


Figura 6: Rango de repeticiones CAG en el gen *HTT*. (Sequeiros J. et al, 2012)

La red de calidad de Genética Molecular Europea (EMQN) define a los alelos de 27-35 repeticiones como 'intermedios' o también con el nombre de "mutable normal" o "grande normal". Ya que están por debajo del rango patológico, pero con potenciales posibilidades de expandirse hacia el rango de repeticiones que implica tener la enfermedad en la próxima generación. (23) Estos son relativamente comunes en la población, con una frecuencia de entre 1 y 7% y un riesgo de expansión de 0.1 a 1% por generación. (46) Frente a esto es importante establecer claramente el número de repeticiones del paciente por PCR y el tamaño del fragmento de CAG que se genera. Esto último, puede ser a través de un gel a una

resolución suficiente para observar la separación de alelos con una diferencia de repeticiones como es el de poliacrilamida, o por High Resolution Melt (HRM) como herramienta flexible basada en la web para predecir curvas de fusión de ADN y perfiles de desnaturalización de productos de PCR, tomado en cuenta que dentro de sus aplicaciones esta la detección de mutaciones, polimorfismos y alteraciones epigenéticas en muestras de ADN bicatenario.(47) o también por electroforesis capilar, ya que constituye una técnica de separación basada en la migración diferencial de moléculas (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.) sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50 μm de diámetro. Esta última recomendada en muchas más ocasiones que las técnicas antes mencionadas por la capacidad de generar el análisis de los diferentes analitos en unos minutos; con pequeñas cantidades de muestra, en el rango de nanolitros, con una alta reproducibilidad, y con un error estándar relativo de tiempo de migración menor a 0,5% pero que requiere reactivos y equipos de mayor costo (48) Sobre las pruebas genéticas para EH, la EMQN establece un error máximo simplificado de ± 1 repetición para los alelos con <40 repeticiones y de ± 3 repeticiones para alelos con >42 repeticiones de CAG.(23).

3.14- Concepto de estandarización de la técnica de PCR.

“La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable (en algunos casos puede superar los seis meses)”. (49)

En general, al realizar una estandarización de una PCR, las condiciones experimentales se basan en un protocolo ya existente que sirve como referencia. El que debe adecuarse a las condiciones propias de cada laboratorio. A partir de este protocolo, se van realizando modificaciones en la mezcla de reacción o en el programa del termociclador en cuestión con el fin de optimizar la amplificación.

4- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La variación de parámetros en la mezcla de reacción y en las condiciones de amplificación permite la estandarización de un protocolo específico de PCR para detectar la mutación de tipo expansión del trinucleótido CAG del gen *HTT* en la enfermedad de Huntington.

4.1- Objetivo general:

- Estandarizar un protocolo de la PCR para la detección de la mutación de tipo expansión del gen *HTT* en la enfermedad de Huntington.

4.2- Objetivos específicos:

- Optimizar los parámetros de la mezcla de reacción de la PCR para la identificación de la mutación de tipo expansión del gen *HTT*.

- Optimizar las condiciones de amplificación de la mutación tipo expansión del gen *HTT*

- Demostrar que la estandarización del protocolo de PCR utilizado permite detectar mutaciones en el gen *HTT* con diferentes números de repeticiones CAG.

5- MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental en el Laboratorio de Medicina Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca, como parte del estudio más amplio “Caracterización clínica y Genética de pacientes chilenos con Enfermedad de Huntington” que se realiza en asociación con el Centro de Trastornos del Movimiento (CETRAM) en Santiago y que cuenta con la aprobación del Comité Ético Científico (CEC) del servicio de salud metropolitano norte de Santiago. (ver anexo 3)

5.1- Extracción de ADN.

La extracción de ADN para este estudio se llevó a cabo a partir de 2 muestras de sangre venosa periférica provenientes del Centro de trastornos del movimiento (CETRAM) en Santiago, previa firma del respectivo consentimiento informado y respetando los principios éticos promulgados en la Declaración de Helsinki. Las muestras se tomaron en tubo de EDTA de 5 ml, para efectos de la estandarización se utilizó sangre de dos participantes diferentes con un número de repeticiones CAG conocido procesados previos a su participación en el estudio y de forma independiente en laboratorios externos por el método de electroforesis capilar de Jama et al. (4) Se identificaron como C007 (participante sano, con un genotipo de 20/22 repeticiones) y C008 (participante clínicamente afectado con EH, con un genotipo de 17/42 repeticiones). El método de extracción se realizó por la técnica de Salting out descrita por Miller.(31)

Se colocaron 5ml de sangre en un tubo cónico de 15 mL y se agregó 10 mL de solución de lisis (NH₄Cl 155Mm, NaHCO₃ 10Mm, EDTA 0.1mM, pH 7.4). Se incubó la muestra en hielo durante 15 minutos, mezclando ocasionalmente de manera suave. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 r.p.m. a 4°C para descartar el sobrenadante y luego resuspender el pellet de leucocitos obtenida en 10 mL de solución de lisis. Luego se agregaron 5 mL y se centrifugó como en los pasos previos. Se eliminó el sobrenadante por

última vez y se lavó el pellet con 5 mL de solución de lisis, para posteriormente resuspender en 6 ml de TE1X (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8). Se añadieron 60 µL de Proteínasa K (10mg/mL) y 300 µL de SDS al 20% y se incubó a 50 °C toda la noche (o mínimo de tres horas). Una vez que los tubos alcanzaron la temperatura ambiente se adicionó 1,5ml de NaCl 5M, mezclándose por un minuto y se centrifugó por 10 minutos a 6000 r.p.m a 4°C. Finalmente el sobrenadante se transfirió a un tubo de 50 ml conteniendo 15 ml de etanol absoluto frío. Al mezclarlo suavemente fue posible observar la malla de ADN, la que fue rescatada con una pipeta Pasteur y lavada con etanol al 70%. El ADN lavado se almacenó en tubo eppendorf de 1.5 ml resuspendido en máximo 1 ml de TE1X (dependiendo del tamaño de la malla obtenida). Este tubo se mantuvo en agitación por al menos 24 horas

5.2- Cuantificación del material genético obtenido.

Una vez extraído el material genético se cuantificó su calidad y cantidad por microlitro con el espectrofotómetro de microgota (NanoDrop). Se seleccionó la opción DNA y lo siguiente fue calibrar con opción “BLANK” en dos ocasiones con 1 microlitro de buffer TE1X. Luego de limpiar el área de medida con papel absorbente se pulsó la opción “MEASURE” para la medición de la muestra, cargando 1 microlitro de la misma. La concentración de ADN viene dada en ng/ul y también se obtiene la calidad del ADN de la relación de lecturas entre 260/280 nm, siendo lo óptimo entre 1,8 y 2.

5.3- Reacción de PCR

La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25 µl, donde se tenían concentraciones estándar para cada componente de un protocolo previo obtenido de Paradisi (42): 2.5 µl de Buffer 10X 25 mM, 2µl de cada iniciador 20 pM, Forward (igual al HD1 de Warner): 5´ ATG-AAG-GCC-TTC-GAG-TCC-CTC-AAG-TCC-TTC 3´ y el Reverse (modificación hecha por Paradisi a partir del HD3 de Warner) : 5´GGC-GGC-GGT-GGC-GGC-TGT-TG

3'. 3 µl de MgCl₂ 3mM, 5 µl de aditivo, 1.5 µl dNTPs 200 µM de cada uno, 0.1 µl Amplitaq Gold polimerasa 1U/ml y 3.9 µl de agua ultra pura. Llegando así a un volumen de 20 µl (tabla 4). Los 5 µl restantes se completaron con la muestra de ADN y agua ultra pura, calculando la cantidad de µl necesarios para tener una concentración de 100 ng/ul. (ver tabla 5). La secuencia de los iniciadores fue tomada de Paradisi et al.2008 (42) y corroboradas en: In silico PCR Genome Browser Disponible en <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. (Anexo 4)

5.4- Modificación de la mezcla para la PCR y del programa de amplificación.

A continuación, se realizó una revisión y comparación sistemática de protocolos similares de PCR para la detección de la mutación causante de la enfermedad de Huntington (ver anexo 2) y basados en esta información se establecieron rangos para el diseño de los experimentos (realizados por duplicado), con variaciones en cada uno de una variable de la reacción de PCR y manteniendo constantes las otras, en el siguiente orden: MgCl₂, aditivo de Taq polimerasa (potenciador para amplificación de regiones ricas en G-C), concentración de ADN, temperatura de alineamiento y número de ciclos de reacción como se describe a continuación:

5.4.1- Variación de concentración de cloruro del MgCl₂:

Se trabajó con concentraciones de 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mM. El frasco original del reactivo se encontraba a una concentración de 25 mM, por lo que se generó una relación directa entre el volumen tomado para cada mezcla y el punto de concentración que se buscaba representar (Tabla 2). Cada tubo de reacción se preparó con su respectivo control negativo. Luego de su uso los reactivos volvieron a ser almacenados en congelación y las muestras de ADN a 4°C.

5.4.2- Variación de concentración del aditivo 360 GC de la Taq polimerasa:

El aditivo 360 GC viene incluido en vial separado, pero junto a la enzima TaqGold polimerasa y se varió entre 10, 20, 30 y 40% v/v, además de una mezcla sin este componente (Tabla 3). El protocolo comercial no indica una concentración molar ni la naturaleza química del aditivo, por lo que, tanto la forma de trabajo, como los resultados, fueron expresados en porcentajes v/v. Cada tubo de reacción se preparó con su respectivo control negativo. Luego de su uso los reactivos volvieron a ser almacenados en congelación y las muestras de ADN a 4°C.

5.4.3- Variación de concentración de ADN:

Para el ADN se tomaron concentraciones de 50-100-150-200 y 300 ng/μl. Calculando la cantidad en μl necesaria de cada muestra (C007) para representar los puntos ya mencionados a un volumen final de 5 uL (Tabla 5). Mientras que, para la mezcla de reacción, que se preparó aparte a un volumen final de 20 uL se siguió el protocolo estándar de Paradisi (Tabla 4). En este caso se preparó un control negativo para todos los tubos, ya que se trataba de la misma muestra. Luego de su uso los reactivos volvieron a ser almacenados en congelación y las muestras de ADN a 4°C.

5.4.4.- Variación del número de ciclos de amplificación:

En este caso la mezcla de reacción se realizó con las condiciones estándar del protocolo de Paradisi (Tabla 6). Esto se llevó al termociclador, generando variaciones de 25, 30 y 35 ciclos. Cada muestra se preparó con su control negativo correspondiente. Luego de su uso los reactivos volvieron a ser almacenados en congelación y las muestras de ADN a 4°C.

5.4.5- Variación de la temperatura de alineamiento de iniciadores:

La mezcla de reacción se realizó con las condiciones estándar del protocolo de Paradisi (42) (Tabla 6). Esto se llevó al termociclador, generando variaciones en la temperatura de alineamiento de los iniciadores de 64°C, 65°C y 66°C. Cada muestra se preparó con su control negativo correspondiente. Luego de su uso los reactivos volvieron a ser almacenados en congelación y las muestras de ADN a 4°C.

Los volúmenes que se modificaban para generar las variaciones se corrigieron con agua ultra pura para no alterar el volumen final de la reacción (25 uL). Cada muestra trabajada se acompañó de un control negativo donde el volumen de ADN fue reemplazado por agua ultra pura.

El programa de inicio según protocolo de Paradisi (42) se basaba en: Desnaturalización prolongada a 94 °C por 3 minutos, desnaturalización a 94 °C por 0.75 minutos, alineamiento de los primers a 65 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1.5 minutos, con un total de 30 ciclos, extensión prolongada a 72 °C por 10 minutos y 23°C para finalizar el proceso.

Componentes como la concentración de la *Taq* polimerasa o los dNTPs no fueron modificados en el presente experimento de estandarización.

5.5- Verificación del producto amplificado.

Para verificar el producto amplificado se utilizó gel de agarosa al 2% (500 mg para un volumen de 25 ml) en cámara de electroforesis horizontal, teñido con 1 ul bromuro de etidio en mezcla de gel, y condición de corrida de 100V constantes por 45 minutos. Se consideró

un volumen de 10 ul de producto amplificado y 1 ul de colorante (Xilencianol) al momento de cargar en los carriles del gel. La observación de este gel se hizo en transiluminador UV y con el sistema de documentación de geles Enduro™ GDS.

La amplificación de las bandas en cuestión, fueron comparadas con pBR322 DNA Msp Digest como marcador de peso molecular, del cual se cargó 1 uL, junto con 1 uL del colorante suministrado por el kit del marcador de peso molecular (gel loading Dye purple)

6- RESULTADOS

Todos los experimentos se hicieron por duplicado. Sin embargo, en este ítem solo se publicaron las figuras que contribuían de mayor forma a la evidencia científica.

Extracción de ADN y cuantificación de muestras C007 y C008:

Durante todo el estudio se trabajó con dos muestras denominadas como C007 y C008 con número conocido de repeticiones CAG en el exón 1 del gen *HTT*. La muestra C007 genotípicamente normal (20/22 CAG), y la C008 heterocigoto para la mutación (22/46 CAG).

Tabla 1: Calidad de extracción de ADN y concentración por microlitro.

Muestra	Calidad	Concentración
C007	1.86	95.1 ng/uL
C008	1.89	92.4 ng/uL

La extracción de ADN para ambos casos se llevó a cabo mediante el método inorgánico descrito por Miller (27) modificado. Como se observa en la tabla 1 se pudo obtener resultados satisfactorios en el ámbito de calidad y concentración para las dos muestras trabajadas.

Variación de la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂).

En la Figura 7 se observa un gel de agarosa del experimento donde se varió concentración de cloruro de magnesio en la reacción de PCR. La banda de 42 repeticiones (banda superior de la muestra C008) debe tener 176 pares de bases. Respecto al marcador de peso molecular ésta, migra según lo esperado aproximadamente a la altura de 180-190 pares de bases, representada en la figura 7 con color rosado. Así mismo la banda de 17 repeticiones debe tener 101 pares de base, migrando también según lo esperado a la altura aproximada de

banda de 90-110-123 pares de bases, representada con color azul. Al observar los carriles se destaca claramente una mayor intensidad del carril M2 por sobre los demás. La mezcla de reacción de este contiene una concentración de $MgCl_2$ de 2 mM, mientras que los otros parámetros no fueron alterados. Por lo tanto, se puede afirmar que esta variación mejoró las condiciones de amplificación. La concentración de $MgCl_2$ de 2.5 mM, como se aprecia en el carril M3 también resultó aceptable. Por otro lado, tanto al disminuir a 1.5 mM (carril M1), como al aumentar a 3 y 3.5 mM la concentración de $MgCl_2$ (carriles M4 y M5) se tiene una visión menos clara de ambas bandas.

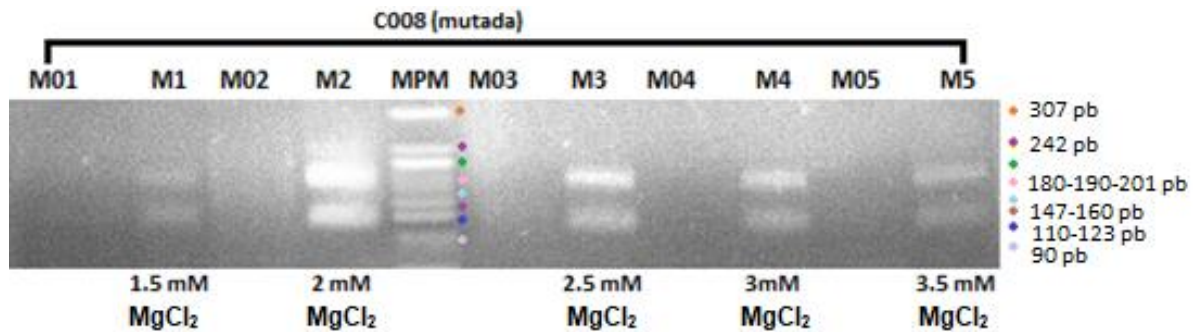


Figura 7: Variación de la concentración de cloruro de magnesio.

Muestra C008 con mutación confirmada por test genético, sometida a concentraciones crecientes de $MgCl_2$ en un volumen final de 25 μ L y corrida en gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 100V y una concentración de ADN de 100 ng/ μ L. Acompañada del marcador de peso molecular pBR322 DNA-MspI Digest (MPM). M1, M2, M3, M4, M5= muestras. M01, M02, M03, M04, M05= control negativo.

Variación del aditivo 360 GC de la *Taq* polimerasa.

En la Figura 8 se observa gel de agarosa de experimento donde se varió concentración del aditivo de la *Taq* polimerasa, apreciándose una leve mejoría en las bandas de la muestra C008 al utilizar el aditivo al 10% v/v (carril A2) por sobre las otras mezclas de reacción. Incluso levemente mejor que con la adición del aditivo al 20% v/v (carril A3). El resto de los parámetros no fue alterado. Al aumentar el volumen de aditivo se puede observar una menor claridad en las bandas, hasta llegar al carril A5, donde aparentemente no habría amplificación detectable en el gel de agarosa. Por otro lado, al no adicionar el aditivo dentro de la mezcla de reacción (carril A1), tampoco hay bandas visibles en el gel.

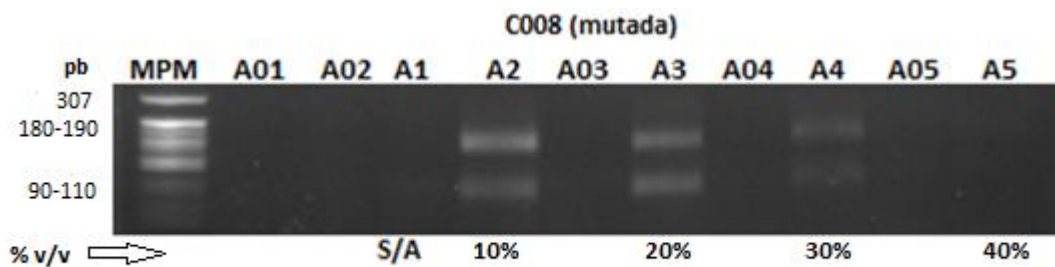


Figura 8: Variación del aditivo. Muestra C008 con mutación confirmada por test genético, sometida a concentraciones crecientes de aditivo (potenciador de la enzima) en un volumen final de 25 uL y corrida en gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 100V y concentración de ADN de 100 ng/uL. Acompañada del marcador de peso molecular (MPM) pBR322 DNA-Mspl Digest. A01, A02, A03, A04, A05= control negativo de cada muestra. A1, A2, A3, A4, A5= muestras. S/A= sin aditivo.

Variación de la concentración de ADN.

En la Figura 9 se observa gel de agarosa de experimento donde se varió concentración de ADN, en este caso se tiene un gradiente de concentración de ADN de la muestra C007 (normal). El carril A2 es el que representa la concentración ideal de trabajo a 100 ng/ul. La banda normal (17 repeticiones) se observa con mayor fluorescencia en este caso. A medida que se aumenta la concentración de ADN va disminuyendo la intensidad de la banda en el gel, hasta llegar al carril A6, donde se vuelve a ver una leve mejoría respecto a los carriles A3, A4, A5. Por último, el carril de menor concentración de ADN (A1) refleja una banda aceptable en cuanto al plano general de la figura, pero aun así no es tan satisfactoria como la banda del carril A2.

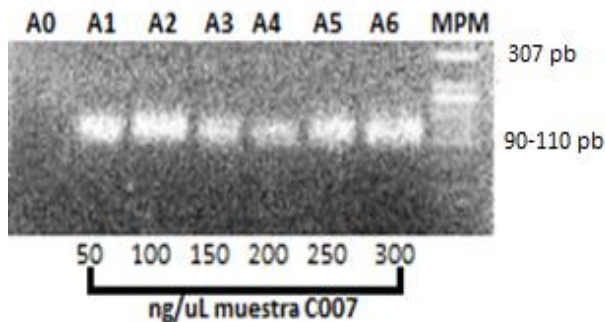


Figura 9: Muestra C007 sin mutación, preparada a distintas concentraciones de esta. En un volumen final de 25 uL en gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 100V. Acompañada del marcador de peso molecular (MPM) pBR322 DNA-MspI Digest. A0= control negativo. A1, A2, A3, A4, A5= muestras.

Variación del número de ciclos en el programa de la PCR.

En la Figura 10 se observa gel de agarosa de experimento donde se varió número de ciclos en el programa de la PCR. Se puede observar simultáneamente el impacto de la variación de ciclos en la etapa de amplificación en ambas muestras. Queda de manifiesto en el carril 30c,

que 30 ciclos es el número más adecuado para la reacción. Si los ciclos son disminuidos, como se observa en los carriles de 25c, la amplificación parece verse afectada y por lo tanto el avistamiento de las bandas en el gel de agarosa es mucho más débil. De la misma forma, aumentar la cantidad de ciclos, como se puede ver en los carriles 35c no favoreció en la calidad de las bandas en ninguna de las dos muestras

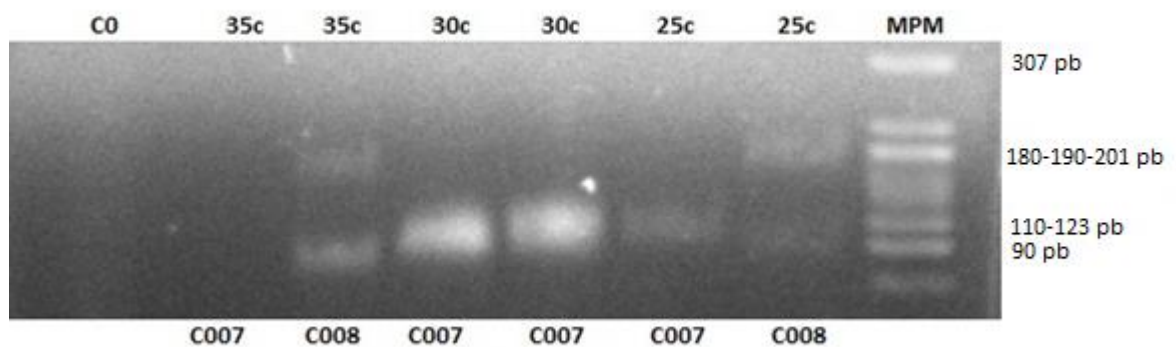


Figura 10: Variación del número de ciclos. Muestra C007 (normal) y C008 (mutada) sometidas a 35 y 25 ciclos de PCR. Y sólo la muestra C007 sometida a 30 ciclos. Concentración de ADN de 100 ng/uL, en todas las muestras. En un volumen final de 25 uL en gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 100V. Acompañada del marcador de peso molecular (MPM) pBR322 DNA-Mspl Digest. C0= control negativo.

Variación de la temperatura de alineamiento de iniciadores en el programa de PCR.

En la figura 11 se observa simultáneamente la variación de la temperatura de alineamiento de los iniciadores. Es posible observar diferencias en la calidad de las bandas incluso con el cambio de un grado de temperatura. En este gel se comparan dos temperaturas diferentes 64 y 65 °C, donde se evidencia una mejor calidad de bandas al realizar la reacción a 65°C. Este hecho se replica en la muestra C007 (normal) y en la muestra C008 (mutada).

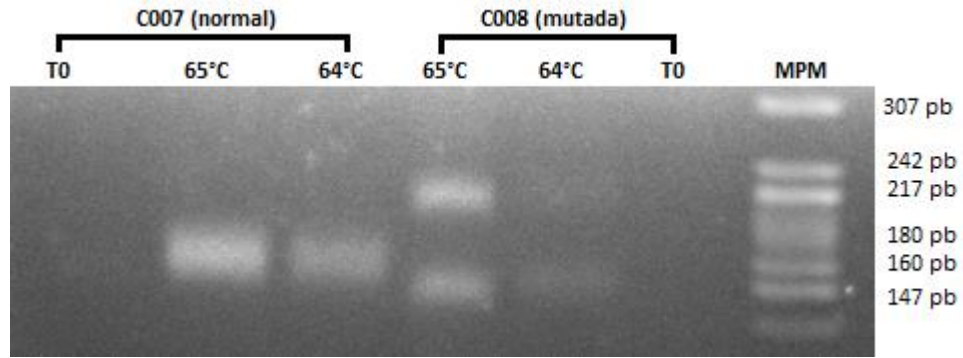


Figura 11: Variación de la temperatura de alineamiento de iniciadores. Muestra C007 (normal) y C008 (mutada) sometidas a distintas temperaturas de alineamiento de iniciadores. En un volumen final de 25 uL en gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 100V. y con concentración de ADN de 100 ng/uL. Acompañada del marcador de peso molecular (MPM) pBR322 DNA-Mspl Digest. T0= control negativo de cada muestra.

En la figura 12 se observa una tercera temperatura de alineamiento de iniciadores de 66°C. Existe una clara disminución en la intensidad de las bandas en el gel en los carriles de 66°C en ambas muestras. No se detectan cambios respecto a la figura 11. La temperatura de alineamiento de iniciadores que genera mejor visualización de las bandas en el gel es la de 65°C.

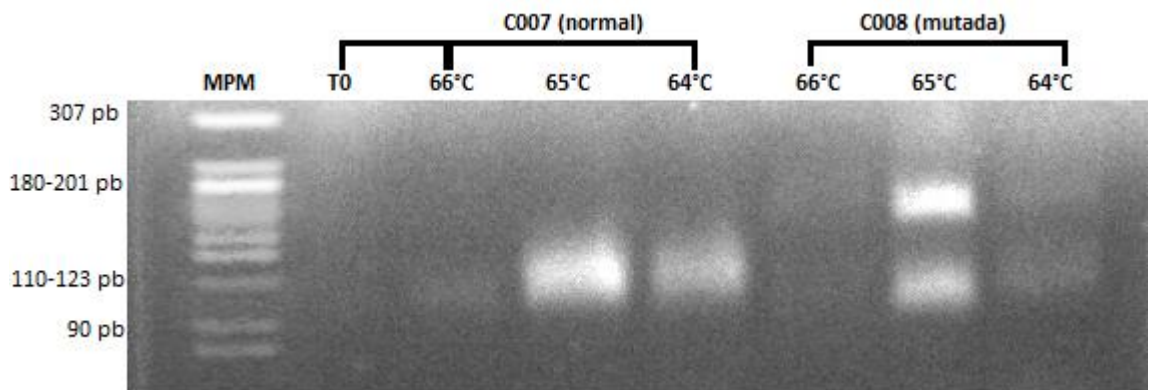


Figura 12: Variación extendida de la temperatura de alineamiento de iniciadores. Muestras C007 y C008 sometidas a mismas condiciones anteriores, pero con tercera variación de temperatura. (66°C). T0= control negativo.

7- DISCUSIÓN

Las mutaciones de tipo expansión de secuencias repetidas de tripletes son características de varios trastornos neurológicos hereditarios en humanos. Enfermedades como la distrofia miotónica, la enfermedad de Huntington, la ataxia espinocerebelosa, el síndrome de X frágil, la ataxia de Friedreich y atrofia muscular bulbo espinal (enfermedad de Kennedy), son causadas por dicho aumento de las repeticiones CTG, CAG, CGG, CCG o GAA, TTC respectivamente. (42) Ante esto, técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa pueden detectar mutaciones de este tipo. Sin embargo, la estandarización de la PCR es un paso fundamental para la optimización del proceso que cobra mayor relevancia cuando se trata de regiones genómicas con expansiones en tándem ricas en guanina y citosina, que habitualmente pueden resultar en un reto técnico para una amplificación reproducible.

Para el caso particular de la EH en este estudio se generaron variaciones en cinco parámetros diferentes para encontrar las condiciones óptimas de amplificación. Estos apuntaron tanto a la mezcla de reacción como a las condiciones de amplificación del equipo utilizado. Previo a la realización de los experimentos diseñados se realizó la extracción de ADN de las muestras de sangre venosa de los participantes, obteniéndose con el método de extracción utilizado resultados óptimos en concentración y calidad de ADN comparables con lo reportado en la literatura (23), lo que resultó fundamental para continuar con los procedimientos.

Al consultar la literatura, queda en evidencia que el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) es uno de los primeros componentes que se debe poner a prueba en la estandarización de la reacción. Esto responde a la directa interacción que tiene con la enzima que lleva a cabo la síntesis del ADN, puesto que específicamente el magnesio cumple un rol de cofactor en el sitio activo de la polimerasa, el que se adiciona en forma de sal. (34) El gradiente de concentración de este metal divalente se delimitó entre cinco concentraciones diferentes en base a publicaciones anteriores relacionadas con la EH, donde se afirma, por ejemplo, que con de

1.5 mM para una reacción con volumen final de 25 uL genera bandas de visibilidad aceptable. (41) Este punto se tomó como el valor mínimo, mientras que el corte superior fue de 3.5 mM queriendo comparar con los buenos resultados obtenidos por Paradisi a 3.2 mM en un volumen final de reacción de 15 uL. (38)

Al analizar las bandas logradas en el gel de agarosa al 2% (figura 7) en un paciente con la mutación, la acentuación de estas en el carril M2 que corresponde a 2 mM es evidente. En contraste con el protocolo inicial donde se sugería la adición de 3 mM por tubo de reacción. Esto no quiere decir que a 3 mM la PCR va a fallar, pero en vista de la mejor visualización y a la vez de un menor uso de reactivo se prioriza el trabajo a la concentración del carril M2, ya que precisamente de esto se trata también la optimización. Los saltos de 0.5 unidades entre punto y punto se seleccionaron de esa manera porque se describe que intervalos muy pequeños en la concentración de magnesio no alteran de forma importante la intensidad de las bandas. Claramente concentraciones bajas son insuficientes y altas son inhibitorias de la reacción. Además, se descartó el uso de buffer TRIS con EDTA por la capacidad de quelar metales divalentes de este último. (50)

La ADN polimerasa AmpliTaq Gold de alta procesividad ha sido diseñada para la amplificación de regiones del ADN ricas en G-C, por lo que, eventos como la formación de dímeros por parte de los cebadores, repeticiones de homopolímeros o fragmentos muy ricos en guanina-citosina (G-C) no alteran del desempeño de la enzima. La cantidad de ADN polimerasa AmpliTaq Gold 360 aumenta lentamente en la reacción con cada número de ciclo, y el rendimiento del producto específico aumenta sin acumulación de productos no específicos. Para asegurar este hecho, en el mismo empaque comercial de la Taq Gold polimerasa se puede encontrar en vial separado un aditivo (360 GC enhancer) con funciones coadyuvantes de la reacción para aumentar la especificidad y procesividad de la enzima en PCR de regiones ricas en G-C (algunos de los más conocidos con estas características son el Dimetilsulfóxido (DMSO), la betaína, entre otros).

El protocolo de la enzima recomienda su uso en un rango de entre 1 a 10 uL para un volumen final de 50 uL, de esta forma se estaría trabajando a un % v/v del 10 al 20%. El protocolo estándar utiliza 20% v/v de aditivo para 25 uL finales. En base a esto trabajó con cinco concentraciones distintas. El primer tubo se hizo reaccionar sin aditivo para comprobar la real participación de este en la mezcla, y, en efecto como se aprecia en la figura 8, el carril A1 tubo amplificación tenue del material genético. Tras esto, se verifica que el reactivo mejora ampliamente la producción cuantitativa y / o cualitativa de la PCR, justificando su utilización, más aún en fragmentos con las particularidades ya mencionadas. (51)

Como límite superior se llegó a adicionar hasta un 40% v/v de aditivo (10 uL de DMSO a un volumen final de 25 uL), tomando como referencia el estudio de Majhoubi et al. (40) donde a esta concentración se obtuvieron amplificaciones óptimas y buen desempeño enzimático. Al observar el carril A2 y el A3 del gel de agarosa en la figura 8, correspondientes a 10% y 20% v/v de aditivo respectivamente, queda una cierta incertidumbre de cuál de los dos amplificó de mejor forma. Cabe destacar que, tanto en este caso, como en todas las otras variaciones realizadas al protocolo inicial, el grado de impacto del cambio generado se midió de forma cualitativa, entendiéndose esto como una mayor o menor intensidad en las bandas de la electroforesis. Por lo tanto, A2 y A3 fueron los mejores exponentes en la variación de aditivo, y al igual que en el caso anterior se privilegia la mejor intensidad al menor gasto de reactivos posible.

En paralelo se pudo observar que un volumen mayor puede ser excesivo ya que generó interferencia en la amplificación y por ende una corrida más débil. No se especifican los componentes del aditivo, pero se sabe que en trabajos similares se utiliza dimetilsulfóxido DMSO al 10% del volumen final como disolvente orgánico en combinación con glicerina para disminuir la amplificación de productos inespecíficos. (39, 40). La concentración óptima de este aditivo puede variar de un protocolo a otro también dependiendo de los iniciadores utilizados en cada uno.

Para encontrar la concentración ideal de ADN a la cual trabajar se tomó en cuenta el estudio publicado por Warner en 1993 (41) . Un rango de entre 50 y 500 ng/uL genera un espectro considerablemente amplio para encontrar la relación óptima entre la cantidad de ADN y la amplificación resultante. Se decide usar este protocolo, y fundamentalmente la variante de ADN que presenta este científico, debido a su alta semejanza con el protocolo inicial de esta investigación. Iniciadores similares, misma cantidad de unidades de la polimerasa, mismo número de ciclos y temperatura de alineamiento. Sin embargo, el límite superior en este caso fue solo hasta 300 ng/uL. No se experimentó con valores menores a 50 ng/uL debido a que, como lo afirma Henegariu et al. (50) cuando el ADN molde se encuentra por debajo de esta concentración, en una mezcla final de 25 uL, los productos obtenidos disminuyen sustancialmente.

En la figura 9, la intensidad de la banda del carril A2 correspondiente a una concentración de ADN de 100 ng/uL, es claramente mayor que entre los demás, concluyéndose que podría ser la mejor concentración para amplificación. Esta situación es concordante con numerosos trabajos, donde se comprueba que existe una relación ideal entre una muestra de 100 ng/uL con 1 unidad de enzima y/o concentraciones de $MgCl_2$ de 1.5 a 2 mM para una mezcla de 25 uL. (2) Al aumentar la cantidad de ADN por microlitro hay una mínima tendencia a bajar la intensidad de la banda a 150, 200 y 250 ng/uL, con nuevo aumento de intensidad a 300 ng/uL. Por lo que la cinética enzimática, a las concentraciones utilizadas de los reactivos en ese experimento pareciera estar en un estado de equilibrio tal que, al variar solo la cantidad de sustrato, y no la de enzima, ésta aún no se ve saturada (47), no pareciendo tan crítica la variación de la concentración de ADN en este caso a diferencia de otras variables en los otros experimentos realizados

La calidad visual de las bandas obtenidas fue considerada aceptable pero no óptima dado el aumento de grosor e intensidad en los carriles, ya que como se observa en el gel, estas no están tan bien definidas como el marcador de peso molecular. Un hecho como este también puede ser atribuible a variables no evaluadas en el estudio y en menor medida a la degradación de las muestras durante su procesamiento.

Para el siguiente experimento se realizaron modificaciones en la programación del termociclador utilizado para variar las condiciones de amplificación. En primer término, se modificó el número de ciclos de la PCR. Basándonos en los aportes de los estudios de Kremer et al., Jama et. al, Vázquez et. al, entre otros. (2, 4, 44) se esperaba que las bandas más intensas de la electroforesis fueran a los 35 ciclos. Sin embargo, se obtuvieron bandas considerablemente más claras al ser amplificadas con solo 30 ciclos (ver figura 10). Coincidiendo con lo propuesto por Bruland et al. (43) en la determinación precisa del número de repeticiones de CAG en el gen de la enfermedad de Huntington, estos resultados podrían explicarse por las diferencias y similitudes de los iniciadores utilizados en los diferentes estudios, siendo uno de los iniciadores utilizados por Bruland et al. igual al utilizado en este estudio mientras que el otro tenía alta homología.

Cuando se disminuyó a 25 los ciclos, se observó una evidente disminución en la intensidad de las bandas tanto de la muestra normal como de la muestra con la mutación. Si bien, se entiende que la débil visualización del producto obtenido en este caso puede responder a que la enzima amplificó en menos ocasiones, autores como Henegariu et al.(50) describen una serie de alternativas para mejorar este panorama. Como ejemplo de esto se menciona aumentar la concentración del buffer en la mezcla, disminuir la temperatura de anillado y de la extensión, y aumentar la cantidad de primers de *loci* débiles.

Cuando se aumentó el número de ciclos a 35, la muestra C008 con la mutación tuvo una intensidad un tanto similar que cuando se programó para 25, pero inferior a los 30 ciclos. Por otra parte, la muestra C007 no amplificó en absoluto a 35 ciclos por lo que el experimento con esta muestra debería repetirse. Un probable sesgo en este resultado fueron los intervalos entre cada tanda de ciclos que se designaron. Ya que a diferencia de la variación del $MgCl_2$, acá el realizar pequeños cambios de a un ciclo si pudiera haber creado un espectro más amplio y con diferencias notorias. Por lo tanto, queda una cierta incertidumbre en cuanto a cómo habría sido la amplificación en puntos intermedios como 28, 32 o 33 ciclos.

La variación en la temperatura de anillado es un paso que debe estar perfectamente estandarizado en una PCR. Cuando hay errores como la aparición de bandas inespecíficas o los productos obtenidos son débiles, una de las primeras soluciones descritas es precisamente reajustar la temperatura de esta etapa. (50) En base a lo anterior se consideró generar variables de este factor, pero que fueran cercanas a la recomendada por el protocolo inicial. Cada par de iniciadores de acuerdo a la concentración, secuencia de bases y longitud tiene temperaturas de fusión diferentes, por lo que es fundamental conocer el entorno “ideal” de los que se usaran para la reacción. El cálculo de las temperaturas de fusión (melting temperature) precisas de los ácidos nucleicos se ha convertido en un paso crucial para la eficiencia y la optimización de numerosas técnicas de biología molecular, como la hibridación *in situ*, la PCR, la selección de antígenos y los microarrays. (52)

Los iniciadores utilizados en este estudio fueron corroborados con el programa *In silico* PCR Genome Browser Disponible en <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. (Anexo 4) que permite simular una amplificación y además tener la “ T_m ” teórica adecuada. El programa sugirió una temperatura de fusión bastante alta en comparación con los 65 °C del protocolo de base. Según el software, el alineamiento a 73 °C otorgaría a la reacción las mejores condiciones. La T_m del iniciador sentido según la hoja de información es de 59,3 °C y la del antisentido es de 72°C° el promedio de ambas es de 65°C, lo que se supone que es la

temperatura óptima y es precisamente la que recomienda el protocolo estándar. Lo ideal es que ambos iniciadores cuando se diseñan tengan T_m similares, pero en este caso no es así por el tipo de región y mutación involucrada. Por otro lado, autores como Jama et. al. y Toth et. al. (4, 39) demostraron que con $64\text{ }^\circ\text{C}$ para el alineamiento se obtenían productos amplificados de buena resolución. Entonces para comenzar se sometieron ambas muestras (C007 y C008) a 64 y $65\text{ }^\circ\text{C}$ (ver figura 11). Se observó que la variación de un solo grado ya generaba cambios evidentes en la intensidad de las bandas. Esto fue aplicable tanto para la muestra con la mutación como para la normal. A los 64°C disminuye considerablemente la amplificación en ambas muestras, dándose por entendido que esa no es la condición ideal para el que los iniciadores se unan a la cadena molde.

Tomando en cuenta lo ocurrido, se incluyó una tercera temperatura correspondiente a 66°C como aparece en la figura 12. Al hacer la comparación de las tres temperaturas siguió prevaleciendo la temperatura recomendada en el protocolo inicial de $65\text{ }^\circ\text{C}$. Y entre 66°C y 64°C se logra discriminar una leve mejoría con la última por sobre la primera. Respecto a la información sugerida por el programa se generó una mezcla de reacción a una temperatura de 71°C , cercana a los 73 ° teóricamente útiles. Esta acción fue respaldada con literatura. Hormozian (42) investigador que utiliza iniciadores similares, obtuvo productos amplificados satisfactorios con una “ T_m ” de 71°C . Para este caso se trabajó con ambas muestras, pero no se logró ninguna amplificación de las muestras. Si bien se observó la presencia de los iniciadores en la parte inferior del gel, no hubo ninguna banda visible. Lo que contradice los datos entregados por el programa de simulación. (figura no mostrada).

A pesar de que se consiguió demostrar diferencias en el proceso de amplificación con las variantes térmicas seleccionadas, autores mencionan que para obtener una “ T_m ” precisa se requieren incrementos de temperatura estrechas de $0,02 \sim 0,2\text{ }^\circ\text{C}$, debido a la alta sensibilidad a pequeñas variaciones. (53) Aunque actualmente existen múltiples herramientas para determinar la temperatura de fusión de los oligonucleótidos, se dan muchas situaciones

en las que la información teórica dista bastante de la real. Por lo tanto, se describe que como la “ T_m ” de un oligonucleótido es un valor de crítica importancia. Su estandarización más confiable y exacta es fundamentalmente empírica. (54)

En lo que respecta a esta investigación, no se generaron modificaciones de los otros componentes de la PCR, puesto que se priorizó interferir en los parámetros fundamentales y considerados más críticos, acotándose además a la disponibilidad de tiempo y reactivos. De todas formas, esta decisión se sustenta en datos bibliográficos como: el poco impacto que tiene generar variación en la concentración de los iniciadores, el aumentar las unidades de la enzima Taq polimerasa puede generar desequilibrio en la amplificación, el uso de agua ultra pura que asegure estar libre de elementos y otros compuestos en partes por billón (p.p.b) que podrían comprometer los resultados de los ensayos por su interacción con las muestras. En cuanto a la alteración de las concentraciones de dNTPs es un acto poco práctico, ya que estos son muy inestables a la constante descongelación durante su uso en cada reacción. (50) Sin embargo, esta concentración debe encontrarse en equilibrio con otros reactivos como la Taq-polimerasa y el ADN molde.

Cabe destacar que los dNTPs y el agua son los principales agentes proclives a contaminación dentro de la mezcla. Situaciones como esta deben ser predichas y minimizadas, teniendo en cuenta que indirectamente también forman parte de la estandarización y posterior reproducibilidad de la técnica. Una recomendación al respecto es realizar alícuotas de cada reactivo a partir de su recipiente original.

8- CONCLUSIÓN

Para la aplicación de cualquier técnica es vital un previo proceso de estandarización. Una vez instaurado, este va a asegurar una alta reproducibilidad y la optimización de sus componentes al máximo.

Esta investigación se propuso como objetivo estandarizar un protocolo de la PCR para la detección de la mutación que origina la enfermedad de Huntington. Al respecto se lograron establecer concentraciones óptimas para cada componente de la mezcla de PCR, así como definir parámetros de amplificación que fueran representativos de las condiciones ideales para la reacción. Para llevar a cabo esto fue necesario una amplia revisión de la literatura que respaldara las acciones prácticas. Por lo que se cumple el objetivo general de esta investigación.

En cuanto a las condiciones óptimas de amplificación que se encontraron, estas fueron comprobadas individualmente, sin embargo, no se realizó una unificación de todas ellas, lo que limitó el panorama general de estandarización. Por otro lado, la etapa cuantitativa del número de repeticiones de las muestras mutadas no fue llevado a cabo, considerándose como una oportunidad para generar temas de futuras de investigación. Este último punto no es al azar, ya que se deja el incentivo para continuar analizando un tipo de trastorno que, particularmente en Chile no ha sido tan estudiado, siendo conscientes de que tanto el costo de su manejo como el nivel de incapacidad alcanzado por un paciente son muy elevados, incluso comparables con la enfermedad de Parkinson.

Por último, se concluye que la optimización de los parámetros de PCR con los iniciadores utilizados incluyó una concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) al 2 mM, ADN a 100

ng/uL, aditivo de la Taq polimerasa al 10% v/v, temperatura de alineamiento de iniciadores de 65°C y 30 ciclos la reacción de PCR, lo que permitió la estandarización de la técnica para la detección de la mutación del gen *HTT*, pudiendo diferenciar claramente un individuo normal de otro con la mutación.

Esta investigación experimental busca ser un aporte para las personas afectadas por la enfermedad de Huntington en Chile, fundamentalmente en el aspecto de estandarizar un protocolo de PCR para ser utilizado en la posterior determinación del número de repeticiones CAG en geles de policacrilamida, método validado y utilizado con buenos resultados en otros países con recursos limitados, por requerir reactivos y equipamiento de menor costo. La estandarización de esta metodología de bajo costo permitiría democratizar el acceso a este tipo de pruebas y así no sólo avanzar en el diagnóstico confirmatorio de los afectados con la EH en Chile si no también con el diagnóstico predictivo para familiares en riesgo, siendo importante para la toma de decisiones personales y también para la posibilidad de brindar inclusión de estas personas en actuales y futuros protocolos de investigación sobre terapias de silenciamiento génico que se desarrollan a nivel mundial con resultados muy prometedores.

9- BIBLIOGRAFIA

1. Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, et al. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3498-503.
2. Kremer B, Almqvist E, Theilmann J, Spence N, Telenius H, Goldberg YP, et al. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet*. 1995;57(2):343-50.
3. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*. 1993;72(6):971-83.
4. Jama M, Millson A, Miller CE, Lyon E. Triplet repeat primed PCR simplifies testing for Huntington disease. *J Mol Diagn*. 2013;15(2):255-62.
5. Miranda C M, Bustamante C L. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. UN IMPORTANTE DESAFÍO PARA CHILE. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2016;27(3):332-7.
6. Cruz-Coke R, Moreno RS. Genetic epidemiology of single gene defects in Chile. *J Med Genet*. 1994;31(9):702-6.
7. Huntington G. On chorea. George Huntington, M.D. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2003;15(1):109-12.
8. Nopoulos PC. Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues Clin Neurosci*. 2016;18(1):91-8.
9. De Souza RA, Leavitt BR. Neurobiology of Huntington's Disease. *Curr Top Behav Neurosci*. 2015;22:81-100.
10. Cocke C. EPIDEMIOLOGIA GENETICA DE COREA DE HUNTINGTON EN CHILE. *Revista Médica de Chile* 1987. p. 483-5.
11. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJ, et al. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology*. 2016;46(2):144-53.
12. Castilhos RM, Augustin MC, Santos JA, Perandones C, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB, et al. Genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. A systematic review. *Clin Genet*. 2016;89(3):295-303.
13. Rodríguez Pupo JM, Díaz Rojas Y, Rojas Rodríguez Y, Rodríguez Batista Y, Núñez Arias E. Actualización en enfermedad de Huntington. *Correo Científico Médico*. 2013;17:546-57.
14. MacLeod R, Tibben A, Frontali M, Evers-Kiebooms G, Jones A, Martinez-Descales A, et al. Recommendations for the predictive genetic test in Huntington's disease. *Clin Genet*. 2013;83(3):221-31.
15. Myers RH. Huntington's disease genetics. *NeuroRx*. 2004;1(2):255-62.
16. Carlos Acevedo González JaMSL. Tratamiento de distonía con estimulación cerebral profunda. *Universitas Médica*. 2016;57:66-82.
17. Mayeux R, Stern Y, Herman A, Greenbaum L, Fahn S. Correlates of early disability in Huntington's disease. *Ann Neurol*. 1986;20(6):727-31.
18. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007;369(9557):218-28.
19. Cardoso F, Seppi K, Mair KJ, Wenning GK, Poewe W. Seminar on choreas. *Lancet Neurol*. 2006;5(7):589-602.

20. Bonilla E. Enfermedad de Huntington. Revisión. Revista Investigación Clínica. Universidad de Zulia. Instituto de Investigaciones Biomédicas. 2000. p. 117-41.
21. Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(5):369-84.
22. Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis. *Neuron.* 2010;67(3):392 - 406.
23. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, Bauer P, Stenhouse SA, Barton DE, et al. EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):480-6.
24. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature.* 1983;306(5940):234-8.
25. Pérez P C, Miranda C M, Segura-Aguilar J. Diagnóstico genético disponible para la enfermedad de huntington en Chile. *Revista médica de Chile.* 2009;137:1128-9.
26. Negrette A. Corea de Huntington. Estudio de una familia investigada a través de varias generaciones. Segunda edición ed1969. p. 62-8.
27. Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, et al. Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15005.
28. MINSAL. Protocolo Enfermedad de Huntington. Tratamiento con Tetrabenazina para la Corea en personas con Enfermedad de Huntington. 2019. p. 9-11.
29. Dora Fonseca Mendoza HMA. Practicas de Laboratorio de Biología Molecular: Su Aplicacion en Genética Básica. In: Bravo NC, editor. editorial Universidad del Rosario ed. Colombia2010. p. 19-20.
30. Chacon-Cortes D. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. In: Griffiths LR, editor. Dove Press journal: Journal of Biorepository Science for Applied Medicine2014.
31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
32. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005;19(6):229-32.
33. Millus K. *Dancing Naked in the Mind Field.* Nueva York: Pantheon Books; 1998.
34. Asuar LE. Guía práctica sobre la técnica de PCR. p. 517-35.
35. Alejandra Serrato Díaz LFR, Palacios JACyES. Reacción en cadena de la polimerasa. p. 53-68.
36. Bruce Albert DB. Introducción a la biología celular. In: Karen Hopkin AJ, editor. 2da edición. Editorial Médica Panamericana ed. Garland Science2006. p. 349-50.
37. Molina Arias M. Características de las pruebas diagnósticas. *Pediatría Atención Primaria.* 2013;15:169-73.
38. Paradisi I, Hernandez A, Arias S. Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. *J Hum Genet.* 2008;53(2):127-35.
39. Tóth T, Findlay I, Nagy B, Papp Z. Accurate sizing of (CAG)_n repeats causing Huntington disease by fluorescent PCR. *Clin Chem.* 1997;43(12):2422-3.
40. Mahjoubi F, Montazeri M, Zare-Kahrizi S, Nafisi S. Employing Real Time PCR for the Diagnosis of Huntington Disease. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences.* 2013;15(7):26-30.
41. Warner JP, Barron LH, Brock DJ. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Probes.* 1993;7(3):235-9.

42. F HaMHaMHSaRGaMMB. Molecular analysis of the (CAG)_N repeat causing Huntington's disease in 34 Iranian families. *Indian Journal of Human Genetics* (ISSN: 0971-6866) Vol 10 Num 2. 2004;10.
43. Bruland O, Almqvist EW, Goldberg YP, Boman H, Hayden MR, Knappskog PM. Accurate determination of the number of CAG repeats in the Huntington disease gene using a sequence-specific internal DNA standard. *Clin Genet*. 1999;55(3):198-202.
44. Vásquez-Cerdas M, Morales-Montero F, Fernández-Morales H, el Valle-Carazo G, Fornaguera-Trías J, Cuenca-Berger P. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*. 2008;50:35-41.
45. Arroyo MAR. Recomendaciones de buena práctica para el diagnóstico genético de la enfermedad de Huntington. In: Trujillo-Tiebas MJ, editor. Elsevier Doyma Medicina clínica de Barcelona 2011.
46. Sequeiros J, Ramos EM, Cerqueira J, Costa MC, Sousa A, Pinto-Basto J, et al. Large normal and reduced penetrance alleles in Huntington disease: instability in families and frequency at the laboratory, at the clinic and in the population. *Clin Genet*. 2010;78(4):381-7.
47. Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*. 2011;27(7):1019-20.
48. Magaña JJ, Arenas-Sordo MdLL, Gómez R. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista médica de Chile*. 2009;137:946-56.
49. Lider GAC. Estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales 2006. p. 2.
50. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997;23(3):504-11.
51. Ralser M, Querfurth R, Warnatz HJ, Lehrach H, Yaspo ML, Krobisch S. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(3):747-51.
52. Dumousseau M, Rodriguez N, Juty N, Le Novère N. MELTING, a flexible platform to predict the melting temperatures of nucleic acids. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:101.
53. Wang J, Pan X, Liang X. Assessment for Melting Temperature Measurement of Nucleic Acid by HRM. *J Anal Methods Chem*. 2016;2016:5318935.
54. Panjkovich A, Melo F. Comparison of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences. *Bioinformatics*. 2005;21(6):711-22.

ANEXO 1

Tabla N°2: Preparación de la mezcla de reacción con variación de cloruro de magnesio.

Reactivos	M1+M01	M2+M02	M3+M03	M4+M04	M5+M05
Buffer	5 uL	5 uL	5 uL	5 uL	5 uL
Primer R	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL
Primer F	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL
MgCl ₂	3 uL	4 uL	5 uL	6 uL	7 uL
Agua	10.8 uL	9.8 uL	8.8 uL	7.8 uL	6.8 uL
Aditivo	10 uL	10 uL	10 uL	10 uL	10 uL
dNTPs	3 uL	3 uL	3 uL	3 uL	3 uL
taqPolimerasa	0.2 uL	0.2 uL	0.2 uL	0.2 uL	0.2 uL
Total	40 uL	40 uL	40 uL	40 uL	40 uL

Volumen final para cada reacción=25 ul, Volumen de la mezcla de reacción por muestra=20 ul. Volumen de mezcla muestra + control negativo= 40 ul. Los 5 uL faltantes a cada tubo se completan con la muestra de ADN (concentración estándar de 100ng/uL)+agua ultrapura. Muestra C008 (M1, M2, M3, M4 y M5): 92.4 ug/uL. 0.9 uL de muestra C008 + 4.1 uL agua ultra pura. Con sus controles negativos (M01, M02, M03, M04 y M05) sin muestra y con sólo 5 ul de agua ultrapura.

Tabla 3: Preparación de la mezcla para la variación de aditivo.

Reactivos	Sin aditivo	A1+A01	A2+A02	A3+A03	A4+A04
Buffer	5 uL	5 uL	5 uL	5 uL	5 uL
Primer F	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL
Primer R	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL	4 uL
MgCl ₂	6 uL	6 uL	6 uL	6 uL	6 uL
Agua	17.8 uL	12.8 uL	7.8 uL	2.8 uL	0 uL
Aditivo	0 uL	5 uL	10 uL	15 uL	20 uL
dNTPs	3 uL	3 uL	3 uL	3 uL	3 uL
taq polimerasa	0.2 uL	0.2 uL	0.2 uL	0.2 uL	0.2 uL
Total	40 uL	40 uL	40 uL	40 uL	42.2 uL

Muestra C008 (A1, A2, A3, A4 y A5): 92.4 ug/uL. 0.9 uL de muestra C008 + 4.1 uL agua ultra pura. Con sus controles negativos (A01, A02, A03, A04 y A05) En el caso de los tubos A4 y A04 se exceden los 20 uL por c/u, por lo tanto, aquí el volumen de muestra varía de la siguiente forma: 0.9 uL de muestra C008 + 3 uL de agua ultra pura. (para no exceder los 25 uL de volumen final).

Tabla 4: Preparación de la mezcla para la PCR. **Tabla 5:** Preparación de muestra C007.

Reactivos	(X1)	(X 6)
Buffer	2.5 uL	15 uL
Primer F	2 uL	12 uL
Primer R	2 uL	12 uL
MgCl ₂	3 uL	18 uL
Agua	3.9 uL	23,4 uL
Aditivo	5 uL	30 uL
dNTPs	1.5 uL	9 uL
Taq Pol	0.1 uL	0.6 uL
Total	20 uL	120 uL

ADN ng/uL	Muestra C007	Agua	Total
50	1.902 uL	3.098 uL	5 uL
100	0.951 uL	4.049 uL	5 uL
150	0.634 uL	4.366 uL	5 uL
200	0.476 uL	4.524 uL	5 uL
300	0.317 uL	4.683 uL	5 uL
Control negativo	0 uL	5 uL	5 uL

Los volúmenes preparados en Tabla 4 corresponden a un control negativo más las cinco variaciones de concentración que se observan en Tabla 5. La concentración de la muestra C007 era de 95.1 ng/uL.

Tabla 6: Preparación estándar de la mezcla para la PCR.

Reactivos	(X1)	(X 3)
Buffer	2.5 uL	7.5 uL
Primer F	2 uL	6 uL
Primer R	2 uL	6 uL
MgCl ₂	3 uL	9 uL
Agua	3.9 uL	11.7 uL
Aditivo	5 uL	15 uL
dNTPs	1.5 uL	4.5 uL
Taq Pol	0.1 uL	0.3 uL
Total	20 uL	60 uL

Los volúmenes preparados corresponden a un control negativo más la muestra C007 (normal) y muestra C008 (mutada).

ANEXO 2

Tabla 7: Revisión y comparación sistemática de protocolos de PCR para la enfermedad de Huntington.

Referencia protocolos PCR	MgCl ₂ [mM]	ADN [ng/uL]	Iniciadores	Enzima [U/mL]	Temperatura alineamiento	aditivo	Volumen reacción uL
Warner, 1993 (41)	1.5	50-500	HD-1 HD-3	1	35 ciclos 65°C	—	25
Kremer, 1995 (3)	2	100	HD-344 HD-450	5	35 ciclos 64°C	—	25
Tóth, 1997 (46)	0.625	300-500	—	1.25	28 ciclos 64°C	120g/L DMSO	40
Bruland, 1999 (49)	25	2 plásmido 50 genómico	HD-482 HD-344	2.5	30 ciclos 58°C	—	25
Hormozian, 2004 (39)	1.5	100	HD-1 HD-3	1.5	35 ciclos 71°C	10% DMSO	25
Jama, 2013 (4)	Pre-mix	15-25	—	1	35 ciclos 64°C	—	20
Majhoubi, 2013 (45)	—	100	—	—	32 ciclos 61°C	10 uL DMSO	—
Vasquez, 2008 (48)	1.5	150	HD-1 HD-3	2	35 ciclos 65°C	—	25
Paradisi, 2007 (42)	3.2	—	HD-1	—	65°C	—	15

ANEXO 3

Carta de aceptación del proyecto: Caracterización clínica y genética de pacientes chilenos con enfermedad de Huntington.



Dirección
Comité de Ética de la Investigación del Servicio de
Salud Metropolitano Norte
Carta N° 016/2019
Dr. JJS/lcc

Santiago, marzo 20 de 2019

Dr. Pedro Chaná
Investigador Principal
Centro de Trastornos del Movimiento
CETRAM
Presente

Ref.: Título del Estudio: "Caracterización clínica y genética de pacientes chilenos con enfermedad de Huntington".

Estimado Dr. Chaná:

Por medio de la presente acuso recibo de su carta de fecha 05 de marzo de 2019 con las modificaciones indicadas por este Comité y se procede a entregar Aprobación al proyecto de la referencia. Adjunto encontrará Consentimiento Informado para participar en Investigación Clínica debidamente firmado, fechado y firmado por el suscrito.


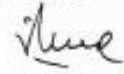
Listado de Integrantes presentes en sesión de fecha 10 de enero de 2019:

Dr. Juan Jorge Silva Solís
Dr. Carlos Navarro Cox
Dra. María de los Ángeles Avaria Benaprés
Dra. Katherina Llanos Parra
A.S. Luis García Hurtado, Representante de la Comunidad

Lo saluda atentamente,


Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud Metropolitano Norte
DR. JUAN JORGE SILVA SOLÍS
PRESIDENTE - CEI-SSMN

Consentimiento informado para participantes:

Consentimiento informado para participar en Investigación Clínica	
Título: CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE PACIENTES CHILENOS CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON. Versión 1.0 del 3 de diciembre de 2018.	
Investigadores responsables:	Pedro Chana, Ernesto Solís
Instituciones Responsables:	Centro de Trastorno del Movimiento CETRAM Escuela de Medicina-Universidad de Talca
Título del Proyecto: CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE PACIENTES CHILENOS CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	
Patrocinante: Centro de trastornos del movimiento (CETRAM) en asociación con la Escuela de Medicina de Universidad de Talca	
Estimado(a) participante:	
El propósito de este documento es entregarle toda la información necesaria para que Ud. pueda decidir libremente si desea participar en la INVESTIGACIÓN que se le ha explicado verbalmente, y que a continuación se describe en forma resumida. Recuerde que debe firmar 2 copias, una es para usted y la otra para el/la investigador/a.	
Resumen del proyecto:	
<ul style="list-style-type: none">• Objetivo: El objetivo de este proyecto es conocer la distribución geográfica, las características clínicas y alteraciones genéticas de los pacientes chilenos con Enfermedad de Huntington que sirvan de base para diseñar estrategias de salud que permitan mejorar la calidad de vida de las familias afectadas.	
<ul style="list-style-type: none">• Procedimientos: El Centro de trastornos del movimiento (CETRAM) es una institución especializada en la atención en salud de individuos afectados con trastornos del movimiento y entre ellos, la Enfermedad de Huntington, lo cual nos ha permitido ubicarlo e invitarlo a participar en esta investigación. Su participación en la misma consiste en su autorización para realizar una revisión de su información clínica que ya ha sido registrada previamente en el CETRAM o elaborar una nueva ficha clínica si es el caso, en ambas situaciones, el fin es recolectar información demográfica, antecedentes tanto personales como familiares, hallazgos al examen físico, y resultados de escalas de evaluación aplicadas previamente como la escala diagnóstica unificada para la Enfermedad de Huntington (UHDRS), de problemas de comportamiento (PBA) y cognitiva (Minimental test), que tomarían 45 minutos en aplicarse de ser necesario y que sólo implican responder algunas preguntas sencillas de forma verbal o por escrito y un examen físico neurológico no invasivo. Luego se tomará una muestra de sangre venosa (5ml) para realizar en el Laboratorio	
 PEDRO CHANA D.S.	  Organismo Asesor de la Dirección Servicio de Salud Metropolitana Norte  20 MAR 2019

del Centro de Investigaciones Médicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca la extracción de ADN (material genético), la prueba genética molecular para la confirmación del diagnóstico de Enfermedad de Huntington y su posterior almacenamiento en el banco de ADN. Si Ud. se ha realizado previamente la prueba genética en otro laboratorio independiente, su participación contribuirá también a la validación de la técnica utilizada en esta investigación.

- **Beneficios:** el registro de sus datos clínicos y la realización de la prueba genética para el diagnóstico de la Enfermedad de Huntington podrá servir para confirmar o descartar ese diagnóstico y que sus médicos puedan ofrecerle una atención médica y asesoramiento genético más adecuado. En el caso de confirmarse el diagnóstico permitirá tener un estimado de las personas en su familia que están a riesgo de padecer la misma enfermedad, lo que a su vez permitirá la planificación de programas de atención médica interdisciplinaria para las familias afectadas. También podría ayudarnos a comprender mejor la sintomatología, la evolución de la enfermedad de Huntington, el comportamiento de la mutación en su familia y en Chile, y diseñar estrategias personalizadas de tratamiento.
- En caso de que Ud. desee conocer el resultado de su prueba genética, se le enviará a los investigadores médicos de CETRAM miembros del equipo de investigación quienes registrarán el resultado en su ficha clínica y lo contactarán para planificar junto con Ud. la entrega de su resultado con el respectivo asesoramiento genético.

¿Desea Ud. desear recibir la información genética derivada de este estudio?..

SI _____ NO _____

- **Riesgos:** La extracción de sangre causa muy pocas molestias. Las personas aprensivas sienten a veces que se marean, o les duele; otras veces puede quedar un pequeño morado en el sitio de punción. La cantidad de sangre que se tomará en este estudio es relativamente pequeña y por lo tanto no conduce a anemia.

- La estandarización de un protocolo descrito para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington podría tener un uso comercial por parte de la Institución en un futuro. Los resultados de esta investigación pretenden ser publicados y/o presentados en revistas y/o congresos científicos respetando el anonimato y confidencialidad de los participantes

- **Costos:** su participación en este estudio que incluye la realización o revisión de su ficha clínica, el examen físico, aplicación de escalas, toma de muestra de sangre venosa, la extracción de ADN y la prueba genética para la Enfermedad de Huntington no tendrá ningún costo para usted y serán asumidos por el estudio y si ocurriera alguna complicación derivada directamente de su participación en el mismo, su costo será asumido por el investigador.

- **Compensaciones:** Dado que se aprovechará su visita a CETRAM por otros motivos DIFERENTES A ESTE ESTUDIO No se compensarán los gastos en que el participante haya debido incurrir (TRANSPORTE, alimentación, entre otros)



[Handwritten signature]

20 MAR 2019

derivados de su participación NI habrá NINGUN pago ADICIONAL.

- **Confidencialidad:** Su ficha clínica y resultados serán confidenciales y se identificará en el estudio con un número y solo los investigadores participantes en este estudio podrán saber a qué nombre corresponde. Su nombre no será usado en ninguna publicación o reporte, estos datos no tendrán aplicación en otro proyecto o por personas ajenas al presente estudio sin su consentimiento previo. El custodio de los datos será el investigador Ernesto Solís Añez. **Obtención, estudio y almacenamiento del material genético:** El ADN se obtiene principalmente de la sangre. Su muestra de ADN podrá ser almacenada con su consentimiento y usada únicamente en esta línea de investigación del CETRAM y de la Universidad de Talca en investigaciones futuras para aprender más sobre la enfermedad de Huntington, La muestra que se obtenga se almacenará en el Banco de ADN de la Universidad de Talca, a menos que usted quiera que se deseché al finalizar el estudio o en un momento posterior. Estas muestras pueden facilitar a los investigadores el desarrollo de pruebas médicas o tratamientos que tengan valor comercial. El paciente no recibirá ningún tipo de compensación económica derivada de la comercialización de esas pruebas o tratamientos.

Desea que su muestra de ADN, después de finalizar este estudio, sea almacenada de forma indefinida, en el Banco de ADN del laboratorio de Medicina Molecular del centro de estudios médicos de la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca, bajo la custodia del investigador Ernesto Adrián Solís Añez:

SI _____ NO _____

- **Comunicación con el investigador:** En caso de dudas adicionales o algún inconveniente relacionado con esta investigación o de sus derechos como sujeto de investigación, puede dirigirse a CETRAM. O contactar directamente al responsable al Dr. Pedro Chaná o al Dr. Ernesto Solís Añez al +56986934718 email: esolis@utalca.cl

Desde ya muchas gracias, saluda cordialmente a usted.

Dr. Pedro Chaná
Investigador responsable

- Estimado participante recuerde que la decisión de participar es absolutamente suya. Puede aceptar o rechazar la investigación, e incluso arrepentirse de su primera decisión, sin ningún problema o represalia para usted. Si desea firmar hoja de revocación debe dirigirse a CETRAM los días jueves de 9:00 a 12:00 y contactar al Dr. Pedro Chaná o Dr. Ernesto Solís Añez.

CETRAM NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte
20 MAR 2019

Declaración

He recibido una explicación satisfactoria sobre el propósito de la investigación la cual consiste en conocer las características clínicas y alteraciones genéticas de los pacientes chilenos con Enfermedad de Huntington, así como de los beneficios de esta información para planificar políticas públicas para mejorar la atención de las familias afectadas y la disponibilidad de la prueba genética para el diagnóstico de la enfermedad en Instituciones públicas.

He sido informado/a sobre las eventuales molestias, incomodidades y riesgos de mi participación en la investigación.

He sido también informado/a que los procedimientos que se realicen como registro y/o evaluación de datos clínicos, evaluación física, aplicación de escalas clínicas, toma de muestra de sangre, extracción y almacenamiento de ADN y realización de la prueba genética no implican un costo que yo deba asumir, es decir, mi participación en el procedimiento no involucra un costo económico alguno que yo deba solventar.

Estoy en pleno conocimiento de que la información obtenida será manejada de manera absolutamente confidencial, esto significa que sólo el equipo investigador tendrá acceso a mis datos y nadie más. En caso de que la información obtenida del estudio sea publicada esta se mantendrá anónima, ello significa que no aparecerá ningún dato con el que puedan identificarme en libros, revistas y otros medios de publicidad derivadas de la investigación ya descrita.

Sé que la decisión de participar en esta investigación, es absolutamente voluntaria. Si no deseo participar en ella, o una vez iniciada la investigación no deseo seguir colaborando, puedo hacerlo sin problemas y sin tener que dar ninguna explicación. Para esto último solo debo presentarme en CETRAM, los días jueves de 9:00 a 12:00m, con el Dr. Pedro Chaná o el Dr. Ernesto Solís firmar la hoja de revocación.

Adicionalmente, los investigadores responsables Dr. Pedro Chaná y Dr. Ernesto Solís, esolis@utalca.cl, +56 986934718 los días jueves en horario de 9:00 a 12:00m han manifestado su voluntad de aclarar cualquier duda que me surja, antes, durante y después de mi participación en la actividad. Además, si deseo realizar mis consultas personalmente el domicilio para estos efectos es CETRAM, con los

CEI-SSM NORTE
Departamento Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

20 MAR 2019

Investigadores responsables Dr. Pedro Chaná y Dr. Ernesto Solís, +56986934718, días martes o jueves, en el horario comprendido entre las 9:00 y las 17:00 horas.

ACEPTACIÓN:

He leído el documento, entiendo las declaraciones contenidas en él y la necesidad de hacer constar mi consentimiento, para lo cual lo firmo libre y voluntariamente, recibiendo en el acto copia de este documento ya firmado.

Yo,(nombre completo),
Cédula de Identidad o Pasaporte N°....., de
nacionalidad....., mayor de edad, con domicilio en
....., **ACEPTO** participar en la
investigación denominada: "CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE
PACIENTES CHILENOS CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON", y **AUTORIZO**
al señor(a) PEDRO CHANA o ERNESTO SOLIS, investigadores
responsables del proyecto y/o a quienes este(os) designen como sus
colaboradores directos y cuya identidad consta al pie del presente
documento, para realizar el(los) procedimiento(s) requerido(s) por el
proyecto de investigación descrito.

Fecha:/...../..... Hora:

Firma de la persona que consiente:.....

Investigador(a) responsable:

.....
Nombre Firma

Co-investigador(a) 1:

.....
Nombre Firma

Co-investigador(a)2:

.....
Nombre Firma



RECHAZO

He leído el documento, entiendo las declaraciones contenidas en él. Sin embargo, rechazo otorgar mi consentimiento, para lo cual firmo libre y voluntariamente el siguiente documento, recibiendo en el acto copia de este ya firmado.

Yo,(nombre completo),
Cédula de Identidad o Pasaporte N°....., de
nacionalidad....., mayor de edad, con domicilio en
....., **RECHAZO** participar en la
investigación denominada: "CARACTERIZACION CLINICA Y GENETICA DE
PACIENTES CHILENOS CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON", y **NO**
AUTORIZO al señor(a) PEDRO CHANA o ERNESTO SOLIS,
investigadores responsables del proyecto y/o a quienes este(os)
designo como sus colaboradores directos y cuya identidad consta al pie
del presente documento, para realizar el(los) procedimiento(s)
requerido(s) por el proyecto de investigación descrito.

Fecha:/...../.....

Hora:

Firma de la persona que rechaza:

Investigador(a) responsable:

.....
Nombre Firma

Co-investigador(a) 1 :

.....
Nombre Firma

Co-Investigador(a) 2 :

.....
Nombre Firma



CEI-SSM NORTE
Organismo Asesor en la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte
[Handwritten Signature]
20 MAR 2019

REVOCACIÓN

Mediante la presente revoco lo anteriormente firmado, para lo cual firmo este nuevo documento libre y voluntariamente, recibiendo en el acto copia de este documento ya firmado.

Yo,(nombre completo),
Cédula de Identidad o Pasaporte N°....., de
nacionalidad....., mayor de edad, con domicilio en
....., **REVOCO** lo anteriormente
firmado.

Fecha:/...../.....

Hora:

Firma de la persona que revoca:

Investigador(a) responsable:

.....
Nombre

.....
Firma

Co-investigador(a) 1 :
.....

Nombre

.....
Firma

Co-Investigador(a) 2 :
.....

Nombre

.....
Firma

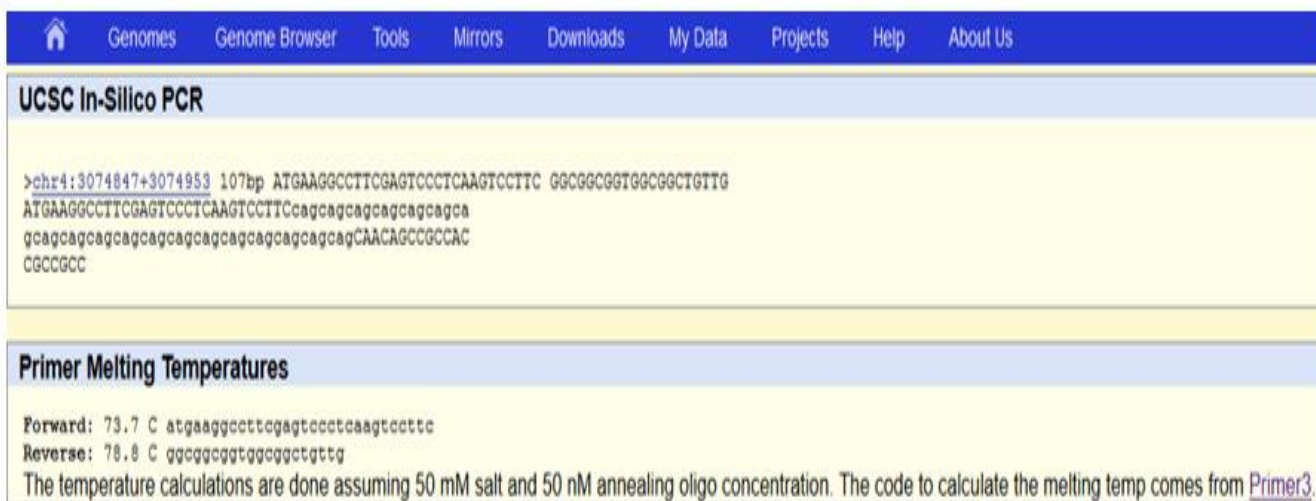
CEI-SSM NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

[Firma manuscrita]

20 MAR 2019

ANEXO 4

Imagen de la temperatura optima de alineamiento de los iniciadores según el programa de simulación UCSC In-Silico



The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. Below this, the tool title "UCSC In-Silico PCR" is shown. The main content area displays a DNA sequence for chromosome 4, coordinates 3074847 to 3074953, and a 107bp region. The sequence is shown in three lines: the top line is the reference sequence, the middle line is the forward primer, and the bottom line is the reverse primer. Below the sequence, the "Primer Melting Temperatures" section shows the forward primer melting at 73.7 C and the reverse primer at 78.8 C. A note at the bottom states that the calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration, and that the code to calculate the melting temp comes from Primer3.

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

```
>chr4:3074847+3074953 107bp ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC GCGGCGGTGGCGGCTGTTG  
ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTCgagcagcagcagcagcagca  
gcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagCAACAGCCGCCAC  
CGCCGCC
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 73.7 C atgaaggccttcgagtcctcaagtccttc
Reverse: 78.8 C ggcggcggtggcggtggtt

The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).