
Optimización del diagnóstico molecular para la Enfermedad de Huntington y la Hemocromatosis

Ana Hurtado Alindes, M.Sc *; María Luisa Guevara-Fujita, M.Sc*; Luis Acevedo*; Ricardo Fujita, Ph.D. *

RESUMEN

La caracterización genética-molecular de las enfermedades es útil para su diagnóstico, pronóstico y, en algunos casos, para diseñar estrategias de tratamiento; esto es posible por el análisis directo de las mutaciones responsables de estas enfermedades.

La Enfermedad de Huntington (Corea) es una enfermedad neurodegenerativa que produce movimientos espásticos; rememorando una coreografía, conlleva a demencia y muerte. A nivel molecular, la enfermedad es causada por una expansión en el trinucleótido (CAG)_n que se encuentra en el exon 1 del gen responsable HD en la región cromosómica 4p16. La hemocromatosis hereditaria es una enfermedad primariamente hepática, que provoca cirrosis, diabetes y deficiencia cardíaca y alrededor de un tercio de pacientes muere por carcinoma hepatocelular. Más del 95% de casos de hemocromatosis en USA y Europa es provocado por mutaciones en el gen HFE (6p21), principalmente por las mutaciones C282Y y H63D. En los laboratorios del Instituto de Genética y Biología Molecular de la USMP se ha implementado el diagnóstico molecular de estas enfermedades como el inicio de un servicio que ya incluye otras anomalías genéticas. Tenemos interés en dirigirlo paulatinamente hacia las enfermedades y mutaciones más frecuentes en las poblaciones peruanas.

Palabras claves: Diagnóstico molecular, enfermedades monogénicas, enfermedad de Huntington, Hemocromatosis.

ABSTRACT

The molecular characterization of the mutations causing hereditary diseases are important tools for diagnosis, prognosis and eventually treatment. Huntington's disease is a neurodegenerative disease producing spastic uncontrolled movements and is caused by the expansion of a trinucleotide (CAG)_n within the first exon of the gene HD located at 4p16. Hemochromatosis is a liver disease causing cirrosis, diabetes and heart problems, in addition one third of patients dies of hepatocarcinoma. Almost all cases of hemochromatosis are due to mutations in the gene HFE at 6p21, being C282Y and H63D the mutations most frequently detected in Europe and USA. We are establishing the molecular diagnosis of different diseases starting with Huntington disease and hemochromatosis as the beginning of a service to the Peruvian community.

Key Words: Molecular diagnosis; monogenic diseases, Huntington disease, hemochromatosis.

INTRODUCCION

Los avances en Genética Molecular han permitido en los últimos 15 años conocer directamente la etiología de muchas enfermedades hereditarias: mutaciones causales en genes, ahora detectadas. El diagnóstico molecular complementa y puede ser de mucha ayuda cuando existen dudas en la percepción de síntomas clínicos en enfermedades hereditarias. Además, es frecuentemente requerido por personas sanas que quieren conocer si son portadores y transmitirán una enfermedad a su descendencia o cuando requieren conocer la prognosis como potenciales afectados.

En el Perú no contamos con laboratorios que realicen el diagnóstico molecular que nos permita determinar con toda precisión el status de afectado (potencial en los casos pre-sintomáticos) o de portador. Por ello, el Instituto de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Martín de Porres, ha implementado el diagnóstico molecular así como el estudio de algunas enfermedades genéticas.

La Enfermedad de Huntington es neurodegenerativa, es decir, produce movimientos involuntarios

(*) Instituto de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de San Martín de Porres.

recordando una coreografía, antiguamente fue llamada Corea de Huntington. Hay perturbación emocional con demencia progresiva, el paciente muere aproximadamente 20 años después del inicio de la enfermedad. Ésta sobreviene a edades variables, comúnmente descendiendo la edad de inicio, a medida que se suceden las generaciones. Es una enfermedad autosómica dominante y su gen responsable, HD ha sido aislado y caracterizado en 4p16. La única mutación casual detectada a la fecha es la expansión de un trinucleótido (CAG) n que se encuentra en el exón 1 de HD. Los cromosomas normales tienen $n = 10-36$, mientras que los afectados tienen $n = 40-200$ (1). La longitud de las expansiones está en proporción directa con la severidad de la enfermedad e inversa con la edad de inicio: en sucesivas generaciones hay más unidades de triplete (2).

La hemocromatosis es una enfermedad autosómica recesiva, común en poblaciones europeas y de Estados Unidos, pero no hay estudios genéticos en Latinoamérica. Más del 95% de casos de hemocromatosis corresponden al tipo I que es provocada por mutaciones en el gen HFE (6p21.3), principalmente por las mutaciones C282Y (mutación de cisteína a tirosina en el codón 282) y H63D (mutación histidina a asparragina en el codón 63) (3). Los síntomas iniciales son sutiles, incluyendo dolor articular en los dedos, pigmentación oscura de la piel, fatiga y depresión. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes desarrollan problemas hepáticos progresando de fibrosis a cirrosis, con una gran incidencia del carcinoma hepatocelular (4).

OBJETIVOS

General: Establecimiento de un servicio asistencial de diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias por medio de la detección molecular de mutaciones.

Específicos: i) Detección de mutaciones de expansión de trinucleótidos en pacientes con la Enfermedad de Huntington. ii) Detección de las mutaciones C282Y y H63D en pacientes peruanos con Hemocromatosis.

MATERIAL Y METODOS

Los primeros para amplificación PCR en hemocromatosis corresponden a las dos mutaciones más frecuentes y los fragmentos han sido digeridos por enzimas de restricción como han sido descritas previamente (4). Los primers y controles positivos (DNA de pacientes con hemocromatosis comprobada y mutaciones determinadas) han sido enviados por el Servicio de Diagnóstico Molecular del Institute de Génétique Moleculaire des Eucaryotes, Université Louis Pasteur, Strasbourg, Francia.

En el caso de Huntington, la detección de la expansión del triplete se ha realizado utilizando la técnica del PCR (5). En un volumen total de 25 μ l se mezclaron 1X del buffer de PCR, 0.5 mM de MgCl₂, dNTPs, 1.5mM de MgCl₂, 7.5 pmoles del primer WR123, 3.72 pmoles del primer R056, 5% de formamida, 0.7 5U de Taq polimerasa y 0.1 μ g del ADN extraído. Los tubos de PCR conteniendo la mezcla se colocaron en un termociclador Amplifon (Thermolyner). La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5', seguido de 35 ciclos de 94°C por 45", 60°C por 45", 72°C por 2' y una extensión final de 72°C por 5'. Los productos amplificados fueron sometidos a la electroforesis en geles denaturantes de poli(acrilamida) al 8%.

En el caso de la Hemocromatosis, la detección de las dos mutaciones más frecuentes C282Y y H63D se ha llevado a cabo utilizando la técnica del PCR y las enzimas de restricción. En un volumen total de MgCl₂25 μ l se mezclaron buffer de PCR, primers, MgCl₂, 0.1 μ g de ADN, Taqpolimerasa y los primers correspondientes para la amplificación. El programa utilizado fue: 92°C - 4'; 30 ciclos de 94°C - 1', 55°C - 1', 72°C - 1' Y una extensión final de 72°C - 7'.

Para la primera mutación (C282Y) se utilizó la enzima de restricción RsaI que reconoce el sitio de restricción (GTAC), que corresponde al codón 282 mutante TAC para tirosina. Normalmente, el codón 282 debe ser TGC o TGT que corresponden al aminoácido cisteína; en ambos casos no son reconocidos/cortados por RsaI. En la otra mutación (H63D) se utilizó la enzima de restricción MboI que reconoce el sitio de restricción GATC, que en el gen reconocerá la mutación de GAT (histidina, mutante) a CAT (asparragina, normal) (4).

Para la detección, las muestras son corridas en condiciones denaturantes en geles de poli(acrilamida) para ver la diferencia de tamaño determinado por su corte/no corte de la enzima de restricción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Huntington.

Se ha extraído el ADN de controles negativos procedentes de estudiantes de la USMP. Este ADN fue amplificado así como los de controles positivos enviados por el Laboratorio de Genética Humana del Instituto de Genética y Biología Molecular y Celular (INSERM - CNRS - Universidad Louis Pasteur, Estrasburgo, Francia) y luego corridos juntos mediante una electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida. En el caso de los controles de estudiantes la expansión de los trinucleótidos (CAG) n es de menos de 36, todo lo contrario ocurre en el control positivo heterocigota en el que un alelo tiene una expansión de más de 36 y el *otro* de menos de 36 (Fig. 1).

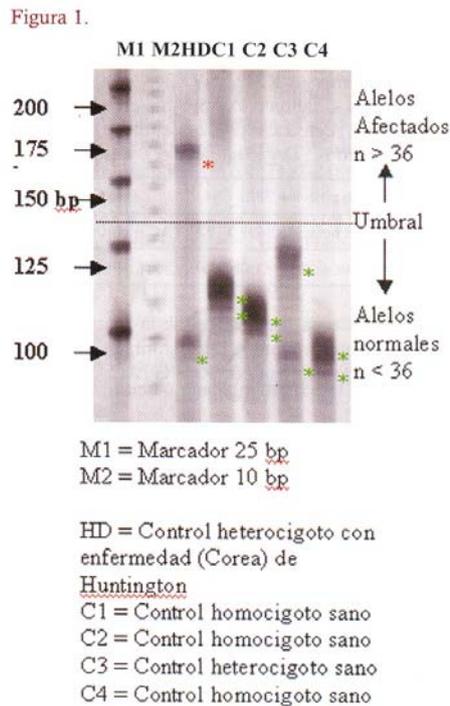


Figura 1. Análisis de la mutación en la enfermedad de Huntington por la expansión de un trinucleótido (CAG) n en el primer exón del gen HD. El DNA del paciente y controles fue amplificado por PCR en el exón 1 y separado en un gel de electroforesis de poliacrilamida para ser visualizado con coloración de nitrato de plata. El umbral para tamaño normal está indicado alrededor de 140 bases en esta prueba. Nótese los diferentes tamaños (polimórficos) en los alelos normales (asterisco verde) comparado con el alelo mutante expandido del paciente heterocigoto HD (asterisco rojo).

Estamos colectando muestras de pacientes de una familia con posible presentación de la Corea de Huntington e igualmente neurólogos asociados están organizando una colecta de muestras para estudiar la historia natural de la enfermedad en el Perú.

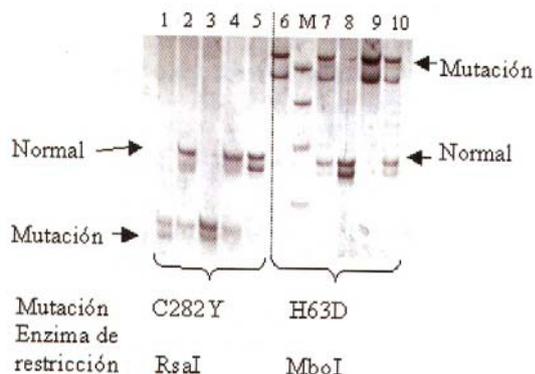
Hemocromatosis.

Se han utilizado controles negativos de ADN procedentes de estudiantes de la USMP. También controles positivos de personas afectadas y padres heterocigotos que han sido enviadas por nuestros colaboradores desde Francia: Controles EK1, E063 para los primers VX242 y VX243 mutación HH C282Y (Cys -cisteína a Tyr-tirosina en aminoácido posición 282) detectado por la enzima de restricción RsaI (Cuadro N° 1) Y (Figura N° 2).

Aminoácido en posición 282	Cys	Tyr
Nucleótidos en posición 845	TGC	TAC = corta con RsaI*
Status del alelo	normal	mutación

Cuadro 1. Causa y detección de la mutación HH Cys282Tyr que provoca la hemocromatosis recesiva. Sitio de reconocimiento de RsaI GTAC.

Figura 2.



1. EK 1, paciente homocigoto para mutación C282Y
2. E063, portador sano heterocigoto
3. Prueba repetida de EK 1
4. Prueba repetida de E063
5. GJ94, individuo sano homocigoto
6. GI93, paciente afectado homocigoto para mutación H63D
7. GI60, portador sano heterocigoto
8. GJ94, individuo sano homocigoto
9. Prueba repetida de GI93
10. Prueba repetida de GI60

Figura 2. Análisis de dos mutaciones comunes en la hemocromatosis. El DNA de los pacientes y controles fue amplificado en la región correspondiente al gen HFE cuya mutación produce hemocromatosis. Luego el DNA amplificado se corta con enzimas de restricción correspondientes y luego es separado por tamaño molecular mediante electroforesis para ser visualizado con coloración de nitrato de plata. En el grupo de la izquierda mutación (carriles 1 al 5) HH C282Y (Cys a Tyr) detectado por RsaI. En el grupo de la derecha la mutación H63D (Asp a Hys) detectado por la enzima MboI.

Análisis para la mutación HH H63D (Asp-ácido aspártico a Hys-histidina en aminoácido en posición 63) Controles GJ94, GI3, GI60 para los primers XM243 y XU25. El análisis de resultados muestra la diferencia entre pacientes y controles en la Figura 2.

Explicación a la Figura 2 sobre la detección de las mutaciones.

Grupo I (a la izquierda carriles 1,2,3,4 Y 5) detección de mutación HH C282Y (Cys a Tyr) cortado con RsaI: en el carril 1 y 3, muestra de un paciente homocigoto con ambas versiones (paterna y materna) con la mutación; por lo tanto, el segmento amplificado es reconocido y cortado por RsaI. El individuo en carril 2 y 4 es heterocigoto y muestra simultáneamente un segmento cortado (mutante) y un segmento intacto (normal), el individuo 5 es una persona que se ha comprobado ser homocigota del alelo normal.

Grupo II (hacia la derecha carriles 6, 7, 8, 9 Y 10) detección de mutación HH H63D (Asp a Hys) cortado con MboI. (cuadro N°2) y (Figura N° 2). Al contrario de la prueba anterior el segmento normal es reconocido y cortado por la enzima MboI mientras que la mutación impide el corte: En el carril 6 y 9, muestra de un paciente homocigoto con ambas versiones (paterna y materna) con la mutación; por lo tanto, el segmento amplificado no es reconocido ni cortado por MboI, permaneciendo intacto. El individuo en carril 7 y 10 es heterocigoto y muestra simultáneamente un segmento cortado (normal) y un segmento intacto (mutante), el individuo 8 es una persona que se ha comprobado ser homocigota del alelo normal.

La detección molecular no solo servirá para aseverar el tipo de enfermedades sino que se podrá aplicar en individuos a riesgo que todavía no han sido diagnosticados con la enfermedad. En el caso de Huntington no existe cura todavía, el diagnóstico permitirá buscar ayuda profesional para preparación psicológica del individuo así como de su entorno familiar (1), (2). En Hemocromatosis, las ventajas son mayores debido a que se puede evitar el desarrollo de la enfermedad con dietas, seguimientos y tratamientos adecuados (3), (4).

Cuadro 2. Causa y detección de la mutación HH H63D (Asp a Hys) que predispone a la hemocromatosis recesiva.

Aminoácido en posición 63	Asp	His
Nucleótidos en posición 187	GAT	CAT
Status del alelo	mutació	normal

CONCLUSIONES

La detección molecular de la enfermedad de Huntington y de la hemocromatosis, ha sido estandarizada en nuestro laboratorio para ser aplicada en pacientes peruanos. El desarrollo de una unidad de diagnóstico molecular en nuestro Instituto se está consolidando paulatinamente y ya estamos siendo requeridos para la determinación genética de algunas familias cuyo diagnóstico necesita ser aclarado.

Ricardo Fujita, Ph.D.

Instituto de Genética y Biología Molecular

Facultad de Medicina Humana Universidad de San Martín de Porres

rfujita@amauta.rcp.net.pe

BIBLIOGRAFIA

1. Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983; 1993.
2. FUJITA, R. Genética molecular y la fisiopatología de las enfermedades hereditarias. *Diagnóstico* 39(6): 313-322; 2000.
3. ROY, C. N.; ANDREWS, N. C. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Human Molecular Genetics*, 10(20): 2181-2186; 2001.
4. BACON, R.; OLYNYK, J.; BRUNT, M.; et al. HFE Genotype in Patients with Hemochromatosis and other Liver Diseases. *Annals of Internal Medicine* 130 (12):953-962; 1999.
5. RUBINZTEIN; et al. Molecular Genetics of the Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 2(10): 1713-1715; 1993.