



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
"MANUEL VELASCO SUÁREZ"**

CAMPO DEL CONOCIMIENTO EN CIENCIAS MÉDICAS

**FRECUENCIA DE MUTACIONES EN LOS GENES ATXN1, ATXN2, ATXN3 Y
FXN EN FENOCOPIAS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON DE
POBLACIÓN MEXICANA**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ GARCÍA

TUTORA DE TESIS:

**DRA. EN C. PETRA YESCAS GÓMEZ
DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MVS"**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DR. MIGUEL ÁNGEL ALCANTARA ORTIGOZA; BIOLOGÍA MOLECULAR, INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA
DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES; GENÉTICA, INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA; GENÉTICA, HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ, GENÉTICA, INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA**

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017.

CIUDAD UNIVERSITARIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

RESUMEN	4
GENERALIDADES	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
JUSTIFICACIÓN	12
METODOLOGÍA	13
a) Diseño del estudio	
b) Población y muestra	
c) Criterios de selección	
-Criterios de inclusión	
-Criterios de no inclusión	
-Criterios de eliminación	
d) Definición y clasificación de variables	
e) Plan de análisis estadístico	
PROCEDIMIENTOS	15
Cuantificación del ADN de sangre periférica	
Evaluación de los genes ATXN1, ATXN2 y ATXN3	
-Resolución de productos de PCR	
a) Purificación a partir de productos de PCR	
b) Purificación a partir de productos de PCR resueltos en geles de agarosa	
-Reacción de secuenciación	
-Purificación de productos de secuenciación	
-Secuenciación automatizada	
-Análisis de cromatogramas	
Evaluación del gen FXN	
-Tamizaje con PCR de triple cebador fluorescente	
-PCR larga para confirmación de expansión	
-Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%	
-Cálculo del número aproximado de repetidos	
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	30
ANEXOS	31
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

Antecedentes: La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo hereditario autosómico dominante, caracterizado por trastornos del movimiento, principalmente corea, alteraciones del comportamiento y deterioro cognitivo. Se produce por mutaciones en el gen *HTT*. Sin embargo, se han descrito pacientes con fenotipo clásico de la EH negativos a mutaciones en *HTT*, y a estos casos se les denomina fenocopias de la EH o bien, enfermedades similares a la enfermedad de Huntington (Huntington disease-like o HDLs). Se han descrito diversos genes como causa de fenocopias de la EH. Dentro de éstos posibles genes, aquellos asociados al desarrollo de ataxias se han presentado como un grupo de entidades que de acuerdo al modo de herencia y a su expresividad variable deben considerarse en el diagnóstico diferencial de fenocopias de la EH.

Objetivo: Determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* y *FXN* como causa de fenocopias de la EH.

Hipótesis: Existen mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* y *FXN* en una proporción de pacientes considerados como fenocopias de la enfermedad de Huntington de población mexicana.

Pacientes y métodos: Se analizarán los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* y *FXN* en 149 sujetos con fenotipo de EH negativos a la mutación del gen *HTT*, mediante PCR, secuenciación automatizada tipo Sanger y análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

Resultados: De un total de 170 individuos mostraron una prueba negativa en *HTT* para descartar de EH, de estos sólo se evaluó el material genético en 148 individuos. Sólo fue posible hallar un defecto molecular en el 2% de los casos y éstos correspondieron a una mutación en *ATXN2*, en tanto que no se identificaron mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN3* y *FXN*. Se determinaron los rangos de repetidos CAG del gen *ATXN1* población mexicana siendo estos de 24 a 34, con una moda de 27 repetidos.

Conclusiones: Las mutaciones en el gen *ATXN2* representan una causa frecuente de fenocopias de la EH en pacientes mexicanos respecto a los genes analizados en este estudio y son la segunda causa más frecuente de fenocopias de la EH en población mexicana, después de las mutaciones en *JPH3*. Dado que la *ATXN2* es la principal causa de ataxia en nuestro país, frente a las formas de ataxia asociadas a corea o los fenotipos similares a EH con prueba negativa en *HTT* debe considerarse la evaluación en este gen.

GENERALIDADES

Los trastornos del movimiento son un grupo de condiciones clínicas con etiología muy heterogénea, los cuales se han categorizado como *hipocinéticos* dependiendo de si su componente principal es la disminución del movimiento o *hipercinéticos* en aquellos que muestran incremento del movimiento. Un trastorno del movimiento que se agrupa en este último rubro es la corea (del griego *coros*, *danza*), un movimiento involuntario abrupto, impredecible y arrítmico, que resulta de un flujo continuo de contracciones musculares aleatoriasⁱ. Dicho movimiento puede presentarse en cualquier región corporal pasando de un lugar a otro sin mostrar algún patrón específico, afecta extremidades, tronco, cuello o musculatura facialⁱⁱ, de tal forma que su gravedad será de acuerdo a si se tiene un compromiso único y focal o bien ser gravemente generalizada con movimientos violentos de las extremidades y el tronco. En ocasiones puede verse restringida a un hemicuerpo (hemicorea).

Al igual que muchas condiciones neurológicas su etiología es muy diversa, se puede encontrar asociada a factores metabólicos, alteraciones estructurales cerebrales, efectos de fármacos y causas genéticas, lo que sugiere que este trastorno del movimiento, independientemente de su etiología, es la manifestación común generada por la disrupción de la neurotransmisión de los núcleos de la base. Por lo que para lograr realizar un diagnóstico certero es necesario que los clínicos aborden el caso de manera amplia, con la indagación de otros casos en la genealogía, la descripción detallada de los movimientos, así también una exploración neurológica completa y la solicitud de laboratorios para descartar otras causas de corea esporádica (Tabla 1).ⁱⁱⁱ

Tabla 1. Evaluación primaria en un paciente con corea.

Prueba	Diagnóstico posible
Química sanguínea	Alteración de glucemia/trastorno hidroelectrolítico
Frotis sanguíneo	Neuroacantocitosis (NAC)
Pruebas de función hepática	Enfermedad de Wilson, NAC
Función tiroidea	Enfermedad tiroidea
Paratohormona	Hipo/hiperparatiroidismo
Prueba de embarazo	Corea gravídica
CPK	NAC, Síndrome de McLeod
Ceruloplasmina	Enfermedad Wilson, Aceruloplasminemia
Anticuerpos anti-DNA, anti-SSA, anti-SSB, anti-Ro, anti-La	Enfermedad autoinmune
Anticoagulante lúpico	Lupus Eritematoso Sistémico
Anticuerpos antifosfolípido	Síndrome antifosfolípido
Prueba VIH	Complejo SIDA
Nivel vitamina B12	Deficiencia B12
Anticuerpos antineuronales anti_Hu, anti-Yo, anti-NMDA	Síndromes paraneoplásicos
Relación lactato/piruvato	Alteración mitocondrial
Alfafetoproteína	Ataxia-telangiectasia
Punción lumbar	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, infección
IRM/TAC	Lesiones estructurales, depósito de metales
EEG	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

La enfermedad de Huntington

Dentro de las causas genéticas de corea, la enfermedad de Huntington (EH) representa la condición más frecuente de corea hereditaria^{iv}. La EH es una condición neurodegenerativa, con modelo de herencia autosómico dominante (AD), que se caracteriza por la presencia de trastornos hiperkinéticos (corea hasta en 90% de los casos), alteraciones cognitivas y del comportamiento.

Su etiología se debe a la expansión del trinucleótido inestable (CAG) en la región codificante del exón 1 en el gen *HTT*, localizado en el cromosoma 4p16.3^v. El tamaño más común de este trazo de repetidos CAG en la población general es de 17^{vi}; cuando existe la presencia de 40 o más repetidos en uno o ambos alelos confiere al fenotipo clásico de enfermedad de Huntington, mientras que un trazo entre 36 y 39 repetidos se consideran como alelos de penetrancia reducida e inicio tardío de la enfermedad. Por otro lado los alelos con 27-35 repetidos CAG se consideran como alelos de expansión intermedia (AI)^{vii}.

Resulta interesante mencionar que hasta en 8% de los casos hay ausencia de datos en la genealogía, lo cual sugiere que esta patología puede manifestarse como eventos *de novo*^{viii} por la expansión de alelos intermedios. Este padecimiento afecta de 5 a 10 individuos por cada 100 000 habitantes en Estados Unidos y Europa. Sin embargo, en México no se cuenta con datos al respecto^{ix}.

Como hemos mencionado el cambio característico a nivel motor es dado por la instauración de movimientos coreicos, que inicialmente ocurren en la musculatura distal de dedos y orjeos, así como también en pequeños músculos faciales. Conforme progresa la enfermedad la marcha se torna inestable, gradualmente los movimientos se propagan a otros músculos de distal a proximal y axial. Estos movimientos se presentan durante todo el periodo de vigilia y se reducen durante el sueño; tanto el habla y la deglución se vuelven difíciles y pueden ser la causa de asfixia en algunos pacientes^{xi}.

La sintomatología psiquiátrica es muy común en estadios tempranos, los cuales representan las primeras manifestaciones de la enfermedad, llegando a pasar desapercibidas o tomadas con poca importancia por el paciente y los familiares; una de las alteraciones más frecuentes es la depresión^{xii}, así como la irritabilidad, apatía, ansiedad y la hipersexualidad, entre otras. Las alteraciones en el comportamiento y alteraciones en el aprendizaje escolar son a menudo la principal sintomatología de la presentación juvenil.^{xiii} El deterioro a nivel cognitivo también es otra de las manifestaciones tempranas, los pacientes son incapaces de organizar su vida o planear cosas que en el pasado eran simples; particularmente hay deterioro en las funciones ejecutivas, errores de apreciación y planeación. El lenguaje se torna lento y todos los procesos psico-motrices se ven severamente afectados.^{xiv}

La evaluación clínica de signos y síntomas representa una herramienta preponderante para el seguimiento sistemático en estos pacientes, para lo cual se han desarrollado diversos instrumentos que tienen como objetivo la evaluación de las manifestaciones clínicas, sin embargo, una de las mejores herramientas ampliamente utilizadas es la *escala unificada de rangos para enfermedad de Huntington* (UHDRS, por sus siglas en inglés) publicada desde 1996,^{xv} cuyos componentes tienen como objetivo la evaluación del ámbito motor, cognitivo, el comportamiento y el estado funcional de los pacientes, previo registro de la historia clínica y del esquema médico terapéutico.

Rutinariamente el diagnóstico se realiza por sospecha clínica y confirmación a nivel molecular, previo consentimiento informado. La mayor parte de los pacientes son adultos al momento de la sospecha y la confirmación diagnóstica se otorga junto con asesoría genética y psiquiátrica.^{xvi}

Sin embargo, como se mencionó no todos aquellos pacientes que presentan un cuadro clínico de EH muestran positividad para el estudio molecular de repetidos CAG, por lo que estos trastornos relacionados han sido denominados como *fenotipos similares a Huntington* (o *Huntington Disease-Like*, en inglés) o bien fenocopias de la EH^{xvii}.

Se estima que de todos aquellos pacientes sometidos a la realización del estudio molecular para EH, sólo el 1% resulta con una prueba negativa^{xviii xix}. De ellos, sólo en 3% será posible encontrar una causa reconocible, lo que significa que existen diversos síndromes clínicos que pueden mostrar un fenotipo *similar a Huntington* pero cuya causa sigue siendo desconocida. No existe una definición formal sobre como considerar una fenocopia de EH, sin embargo, de acuerdo con Wild et al.^{xx} puede tomarse a consideración: (1) un desorden del movimiento consistente con EH, (2) que muestre un estudio negativo para la expansión de trinucleótidos en *HTT* y (3) que muestre historia familiar compatible con herencia AD o bien historial de manifestaciones psiquiátricas o del comportamiento.

-Trastornos similares a Huntington (Huntington Disease-like)

A la fecha se han caracterizado cuatro cuadros clásicos de fenocopias de EH, de las cuales 3 tienen un origen genético específico con modelo de herencia autosómico dominante, mientras que la entidad restante muestra un patrón de herencia autosómico recesivo (AR) y no ha sido posible dilucidar su causa.

- HDL1 (del inglés *Huntington Disease-Like 1*) es una entidad producida por mutaciones heterocigotas en el gen *PRNP*^{xxi}, que codifica para la proteína Prión, debido a la inserción de 192 pares de bases hacia la región 5', la cual se localiza una región que codifica un octapéptido que se repite 8 veces. Los síntomas clínicos se caracterizan por cambios en la personalidad, síntomas psiquiátricos, deterioro cognitivo, corea, rigidez y disartria. Tiene un patrón de herencia autosómico dominante y se considera una entidad poco frecuente por su baja prevalencia de 1 en 1,000,000 individuos.
- HDL2 se debe a alteraciones en el gen que codifica para la proteína Juntofilina 3^{xxii} que produce un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante, causado por la expansión de trinucleótidos CTG entre el exón 1 y 2 que contiene una región de *splicing* (corte y empalme) múltiple en *JPH3*, el cual se sitúa en el locus 16q24. Los alelos silvestres contienen entre 6 a 28 repeticiones de trinucleótidos, mientras que el rango de repetidos patológicos va de 40 a 59^{xxiii}. Los síntomas clínicos incluyen pérdida ponderal, alteración en la coordinación, rigidez, disartria, hiperreflexia, bradicinesia, distonia y temblor, así como el desarrollo de corea leve y trastorno de los movimientos oculares. El desarrollo de sintomatología psiquiátrica y demencia son frecuentes. La neuropatología muestra afección del núcleo caudado, putamen y menor compromiso del globo pálido.^{xxiv}
- La HDL3 es una enfermedad neurodegenerativa con modelo de herencia autosómica recesiva, caracterizada por deterioro cognoscitivo, disartria, distonia, sintomatología piramidal, ataxia y deterioro de la marcha, a la fecha sólo ha sido reportada en dos familias de Arabia Saudita y no ha sido posible dilucidar el gen causal^{xxv xxvi}.

- HDL4 también conocida como *ataxia espinocerebelosa tipo 17*^{xxvii} (SCA17, por sus siglas en inglés), es causada por una expansión del repetido CAG/CAA en el gen *TBP* (locus 6q27), que genera tractos de poliglutaminas (poliQ) en la proteína de unión a la caja TATA^{xxviii}. El rango habitual de repetidos es de 25-40, las expansiones entre 41 y 45 constituyen un rango intermedio con penetrancia incompleta y un número igual o superior a 46 se considera como mutación. Las manifestaciones clínicas implican inestabilidad de la marcha, distonia, corea, alteración psiquiátrica como alteración del estado de ánimo, depresión, psicosis y demencia.

-Otras fenocopias reconocidas de la EH

Por otro lado, se han descrito alteraciones genéticas en otros loci que pueden ser causa de una fenocopia de la EH, dentro de estas encontramos:

- *Neuroacantocitosis*, se trata de una forma de corea hereditaria anteriormente conocida como core-acantocitosis. Es un trastorno degenerativo que puede tener una amplia gama de manifestaciones clínicas y anomalías en las determinaciones de laboratorio como la presencia de acantocitos^{xxix}. La edad de presentación frecuentemente es entre la tercera y cuarta década de la vida, las primeras manifestaciones comprenden movimientos orolinguales (con predominio de distonia), posteriormente desarrollo de tics, corea y movimientos estereotipados^{xxx}. Otras características incluyen cambios cognitivos y de personalidad, crisis convulsivas, disfagia, disartria, oftalmoparesia, parkinsonismo y elevación de creatinina cinasa sin evidencia de miopatía. A nivel de neuroimagen se puede apreciar atrofia del estriado. Su etiología se debe a mutaciones recesivas en el gen *VPS13A* (9q21), sin embargo también se ha descrito que mutaciones heterocigotas pueden desencadenar el cuadro clínico^{xxxi}.
- La *Atrofia Dentato-rubro-pálidolusiana*^{xxxii} (DRPLA, por sus siglas en inglés) es una enfermedad neurodegenerativa causada por una expansión del trinucleótido CAG en el gen *ATN1* en 12p13, los alelos normales son de hasta 35 repetidos y son altamente polimórficos, mientras que los repetidos patogénicos muestran entre 40 y 100 repetidos CAG. Es un trastorno muy frecuente en Japón, aunque se han identificado diversas familias sin ascendencia japonesa^{xxxiii xxxiv}. El fenotipo de esta entidad es variable y puede presentar ataxia, corea, mioclonías, demencia, atrofia cerebral y cerebelar.
- *Neurodegeneración cerebral por acúmulo de hierro* (NBIA, por sus siglas en inglés) engloba un grupo de enfermedades que se caracterizan por el depósito de este mineral a nivel de los núcleos de la base. Se conocen diversos genes asociados al desarrollo de esta condición, pero solo 2 asociados al desarrollo de fenocopias de EH, *PANK2* y *FTL*. El gen *PANK2* se localiza en 20p13, y sus mutaciones producen una deficiencia de la enzima pantotenato cinasa, clínicamente caracterizada por la presencia de síntomas extrapiramidales en 98% de los casos, cambios del comportamiento seguidos por demencia y degeneración pigmentaria de la retina.^{xxxv xxxvi} La edad de presentación característica es alrededor de los 3-4 años. Sin embargo, los casos de presentación en la edad adulta se asocian al desarrollo de corea^{xxxvii}. El gen *FTL* codifica para la cadena ligera de ferritina y se localiza en el cromosoma 19q13.3. El fenotipo clínico asociado a sus mutaciones es la neuroferritinopatía (NFP), una enfermedad neurodegenerativa,

autosómico dominante; la cual se caracteriza por la afección del sistema nervioso central, generando trastornos de movimiento (incluyendo corea)^{xxxviii}, anormalidades de comportamiento y discapacidad cognitiva. La neuropatología está caracterizada por la presencia de cuerpos de inclusión de ferritina intranuclear e intracitoplasmática en células de la glía y en algunos conjuntos de neuronas, y depósitos anormales de hierro. La proteína mutada ocasiona defectos en el manejo de hierro intracelular, agregados de ferritina y daño oxidativo, lo cual conlleva a una pérdida de función normal y ganancia de función tóxica de la ferritina.^{xxxix xl}

- Alteraciones del gen *FXN* causante de la Ataxia de Friedreich, la cual es una enfermedad con modelo de herencia autosómico recesiva (AR), es la primera causa de ataxia AR en población caucásica. Su cuadro clínico se caracteriza por un inicio en la infancia, desarrollo de ataxia, disartria y alteraciones sensitivas, a nivel de neuroimagen el volumen del cerebelo se encuentra conservado a diferencia de las ataxias espinocerebelosas (SCAs, por sus siglas en inglés). Se ha descrito, aunque con poca frecuencia como causa de fenocopias de la EH ^{xli xlii}. El gen *FXN* (9q13) se encuentra formado por siete exones que abarcan cerca de 80 kb^{xliii}. Bajo condiciones normales, codifican para una proteína de 210 aminoácidos denominada Frataxina (*FXN*). La mutación más común es la expansión anormal de un triplete repetido GAA dentro del primer intrón del gen. En individuos sanos, el rango de repeticiones es de 6 a 36 repeticiones, se consideran los términos de *alelo corto normal* cuando tienen una composición de 6-10 repetidos, *alelo largo normal* cuando es de 12-36 y premutación entre 37-65^{xliiv}, mientras que en la mutación el número de repeticiones varía de 70 a 1700^{xliv}.
- *Corea hereditaria benigna*, es un trastorno infrecuente con modelo de herencia AD de inicio en la niñez que mejora en la adultez, se debe a mutaciones en el gene *NKX2-1* (anteriormente denominado *TITF1*). Los pacientes pueden tener historial de hipotiroidismo y problemas respiratorios, como el síndrome de distrés respiratorio alveolar neonatal o la enfermedad pulmonar intersticial, ya que *NKX2-1* es un factor de transcripción esencial para el desarrollo de los núcleos basales, el tiroides y los pulmones^{xlvi}. Clínicamente se caracteriza por retraso en el desarrollo de la marcha, desarrollo de hipotonía y corea desde la infancia, además puede estar presente distonía, mioclonus y tics^{xlvii}.
- Desde el año 2011, la repetición de un hexanucléotido GGGGCC en el gen *C9ORF72* fue identificado en grandes familias que mostraban degeneración frontotemporal (DFT) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA)^{xlviii}. Dicha alteración se trata de una mutación intrónica en un gen altamente conservado, el cual muestra homología con la superfamilia de proteínas DENN^{xlix}, sugiriéndose una posible función como regulador del tráfico de membranas. Dichas mutaciones patogénicas presentan cientos a miles de estos repetidos^l. Hensman Moss et al.^{li} estudiaron una cohorte de 514 fenocopias de EH para la expansión del hexanucléotido en *C9ORF72* y encontraron a 10 sujetos con mutación (1.95%), lo que sugiere que dichas mutaciones representan la causa más frecuente de fenocopias de EH; por otro lado Kostić et al.^{lii} evaluaron una pequeña cohorte de 39 fenocopias de EH encontrando un paciente (2.6%) positivo para la mutación. De manera más reciente Koutsis et al.^{liii} también evaluaron la repetición del hexanucléotido en una cohorte de 40 fenocopias de EH, encontraron mutación en el 5% de los casos, lo cual reitera que dicho cambio es probablemente la causa más frecuente en fenocopias de EH.

-Otros síndromes que pueden generar corea

Existe una amplia lista de condiciones que pueden cursar con corea, dentro de éstas las SCAs, autosómico dominante se han presentado como un grupo de entidades que de acuerdo al modo de herencia y a su expresividad variable deben considerarse en el diagnóstico diferencial de fenocopias de la EH.^{liv}

- La SCA1 además de los datos de afección cerebelosa puede cursar con parkinsonismo, distonía y corea. Su patogénesis es debida a una expansión de trinucleótidos CAG cuando se sobrepasa el umbral patogénico igual o mayor de 39 repetidos en el gen *ATXN1*^{lvi} ^{lvii}.
- La SCA2 es un cuadro de afección pancerebelosa de lenta progresión que de manera similar puede mostrar parkinsonismo, distonía, corea y demencia. También se debe a una expansión de repetidos CAG en número igual o mayor a 33 en *ATXN2*^{lviii} ^{lix} ^{lx}.
- Por último la SCA3 o enfermedad de Machado-Joseph, también debida a repetidos CAG codificantes para tractos de poliQ iguales o mayores a 53 en *ATXN3* puede mostrar parkinsonismo, distonía y corea ^{lxi}.

-Grupos de investigación y sus aportes en evaluación genética de fenocopias de EH

Diversos grupos a nivel internacional han realizado evaluaciones en genes asociados a corea hereditaria (**Tabla 2**). Sin embargo Costa, et al.^{lxii} en su serie de 107 casos de fenocopias en Portugal, adicionalmente evaluó los genes *POU3F2* (codificante de un factor de transcripción específico del sistema nervioso central, cuya región codificante contiene repetidos de CAG) y *CREEBP* (el cual codifica para una proteína nuclear coactivadora de la transcripción, que ha sido hallada en inclusiones intranucleares neuronales en pacientes con enfermedades por expansión de poliQ). Por esta razón, tales genes fueron considerados como posibles candidatos en trastornos neurodegenerativos de inicio tardío, sin embargo a la fecha no se han logrado asociar como causa de fenocopias de EH.

Tabla 2. Grupos de investigación en genética de fenocopias de EH.

Grupo	Investigación	Resultados
Keckarević, et al. 2005 ^{lxiii}	48 fenocopias en Yugoslavia evaluadas para <i>PRNP</i> , <i>FTL</i> y <i>JPH3</i>	Sin mutaciones.
Costa, et al. 2006 ^{lvii}	107 fenocopias en Portugal evaluadas para <i>PRNP</i> , <i>JPH3</i> , <i>TBP</i> , <i>ATN1</i> , <i>CREBBP</i> , <i>POU3F2</i> y <i>FTL</i> .	Sin mutaciones.
Wild, et al. 2008 ^{xxxvi}	285 fenocopias en Reino Unido evaluadas para <i>PRNP</i> , <i>JPH3</i> , <i>TBP</i> , <i>DRPLA</i> , <i>ATXN1</i> , <i>ATXN2</i> , <i>ATXN3</i> , <i>FTL</i> y <i>FXN</i>	5 casos <i>TBP</i> 1 caso <i>PRNP</i> 1 caso <i>JPH3</i> 1 caso <i>FXN</i>
Rodrigues, et al. 2011 ^{lxiv}	29 fenocopias en Brasil evaluadas para <i>ATXN1</i> , <i>ATXN2</i> , <i>ATXN3</i> , <i>JPH3</i> , <i>DRPLA</i> y <i>VPS13A</i> .	3 casos <i>JPH3</i> 1 caso <i>VPS13A</i>
Castilhos, et al. 2014 ^{lxv}	104 casos índices evaluados para <i>HTT</i> , <i>ATXN2</i> , <i>TBP</i> , <i>ATN1</i> , <i>JPH3</i> , <i>FTL</i> , <i>NKX2-1/TITF1</i> y <i>VPS13A</i>	4 casos <i>JPH3</i> 1 caso <i>ATXN2</i>
Hensman, et al. 2014 ^{lxii}	514 fenocopias evaluados para <i>C9ORF72</i>	10 casos
Kostić, et al. 2014 ^{lxiii}	39 fenocopias evaluados para <i>C9ORF72</i>	1 caso
Koutsis et al. 2015 ^{lxiii}	40 fenocopias evaluados para <i>C9ORF72</i>	2 casos

-La experiencia en el estudio de fenocopias de la EH en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

En el departamento de Genética del INNN MVS, en un estudio de primera fase de un total de 1521 casos evaluados para el gen *HTT* por sospecha de EH, 102 resultaron negativos, lo cual corresponde a 6.7% del total de la muestra.

En dichas muestras se realizó un estudio de primera fase (datos en proceso de publicación), en donde se evaluaron los genes para HDL1-4, *ATN1* y *FTL*. En estas fenocopias de EH se logró determinar la causa en 8.8% de los casos, de estos el 83% (8 casos) mostraron una alteración en el gen *JPH3* y en un 17% (1 caso) mostró alteración en el gen *TBP*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Las enfermedades que cursan con trastornos en el movimiento del tipo coreiforme representan un reto diagnóstico debido a que, en la mayor parte de los casos, integran a diversas condiciones de etiología heterogénea, con un curso crónico que confina incapacidad y pérdida de la calidad de vida, ya que el desarrollo de estas manifestaciones se producen en individuos que se encuentran en edades productivas de la vida.

A la fecha se han descrito diversas causas genéticas que producen un fenotipo similar a la enfermedad de Huntington. Por ello nos preguntamos:

¿Cuál será la frecuencia de mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* y *FXN* en fenocopias de la enfermedad de Huntington de población mexicana?

HIPÓTESIS

-Se identificarán mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* y *FXN* en una proporción de pacientes considerados como fenocopias de la enfermedad de Huntington de población mexicana.

OBJETIVOS

Primario:

Determinar la frecuencia de mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* y *FXN* en fenocopias de la EH de población mexicana.

Secundarios:

Proponer un esquema de abordaje para el estudio molecular en fenocopias de EH de acuerdo a las frecuencias resultantes y las manifestaciones clínicas.

Determinar si existen diferencias entre las calificaciones clínicas obtenidas mediante el instrumento UHDRS de acuerdo a los genes que resulten alterados.

JUSTIFICACIÓN

A la fecha se desconoce la frecuencia de las mutaciones en estos genes en las fenocopias de la EH de la población mexicana y dado la gran heterogeneidad etiológica de la corea similar a la EH, es preponderante precisar en estos pacientes la posible causa genética, para poder otorgar un asesoramiento genético certero en el paciente y su familia. Así como determinar los riesgos de recurrencia en la descendencia, ampliar la posibilidad de realizar diagnósticos presintomáticos y eliminar la incertidumbre en los familiares.

METODOLOGÍA

a) *Diseño*

- Por análisis: analítico.
- Por recolección de los datos: ambilectivo.
- Por intervención: observacional.
- Por diseño: transversal.

b) *Población y muestra*

Se incluyeron todos aquellos casos de pacientes (formas esporádicas y familiares) considerados como fenocopias de la enfermedad de Huntington que habían sido evaluados previamente para los genes *HTT*, *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL* con un resultado negativo; y todos aquellos casos nuevos considerados como fenocopias de EH.

c) *Criterios de selección del estudio*

Criterios de inclusión: Todos aquellos individuos de cualquier edad, de cualquier género, que sean mestizo-mexicanos (donador nacido en el estado de reclutamiento, y lo mismo sus dos padres y cuatro abuelos), que hayan sido determinados como no EH mediante la prueba molecular para *HTT*, que hayan sido tamizados para los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL* con resultado negativos, así como todos los individuos de reciente determinación como no EH.

Criterios de exclusión: Muestras de pacientes que se encontraban degradadas y muestras que no sean evaluadas por el panel de genes propuesto.

d) *Análisis Estadístico*

Se realizó estadística descriptiva de acuerdo a la distribución de las variables cuantitativas. Se utilizó frecuencias y porcentajes para variables cualitativas.

d) Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Demográficas			
Edad	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta el momento en el que se capturan los datos.	Años	Cuantitativa discreta
Sexo	Determinación biológica del sexo al nacimiento.	1=Hombre 2=Mujer	Cualitativa dicotómica
Edad de inicio	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta el inicio de la sintomatología.	Años	Cuantitativa discreta
Tiempo de evolución	Tiempo transcurrido en años desde el inicio de la sintomatología hasta el momento en que se capturan los datos.	Años	Cuantitativa discreta
Edad de fallecimiento	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta la muerte.	Años	Cuantitativa discreta
Independientes			
Mutación	Cambio en la secuencia nucleotídica en un gen que se asocia a enfermedad.	-Mutación en <i>ATXN1</i> -Mutación en <i>ATXN2</i> -Mutación en <i>ATXN3</i> -Mutación en <i>FXN</i>	Cualitativa nominal
Dependientes			
UHDRS -Puntuación motriz -Puntuación conductual -Puntuación funcional -Grado de independencia -Capacidad funcional	Puntuación obtenida durante la aplicación de la escala en un momento determinado.	-Puntaje (0-124) -Puntaje (0-224) -Puntaje (0-25) -Porcentaje % -Puntaje (0-13)	Dimensional Cuantitativa discreta Cuantitativa discreta Cuantitativa discreta Cuantitativa discreta Cuantitativa discreta

PROCEDIMIENTOS

A partir del banco de DNA de pacientes determinados como negativos a la EH y considerados como fenocopias de EH del departamento de Genética, se seleccionaron todos aquellos casos que habían sido previamente analizados para las pruebas moleculares de los genes *TBP*, *JPH3*, *PRNP*, *ATN1* y *FTL*, con resultado negativo. Mientras que se recopilaban todos los casos nuevos con determinación negativa para la mutación en *HTT*, a los que se les aplicó el panel de genes completo.

-Protocolo extracción de DNA con Buffer de Lisis de Glóbulos Rojos (BLGR)

1. Se transfirieron 3mL de sangre periférica en un tubo cónico 15 mL.
2. Se agregaron 3 veces el volumen de buffer BLGR y se mezclaron por inversión varias veces.
3. Se centrifugó a 3000 rpm por 6 minutos. Luego se decantó con precaución. Posteriormente al botón obtenido se agregó 1mL de BLGR se agitó para resuspender.
4. Se pasó a un tubo eppendorf de 1.5mL, se agitó hasta homogenizar.
5. Se centrifugó a 3000rpm por 2 minutos. Luego se decantó para conservar el botón.
6. Se agregó 1mL de BLGR, se agitó y resuspendió el botón. Se repitió este paso hasta que quedó blanco el botón.
7. Al botón limpio se le agregó 570 μ L de NaCl 5mM, se agitó durante 2 minutos; se agregaron 40 μ L de SDS al 10%, se agitó durante 5 min y se agregaron 200 μ L de NaCl saturado y se agitó durante 10 minutos.
8. Se centrifugó a 11500 rpm por 20 minutos a una temperatura de 4°C.
9. Se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 600 μ L de alcohol isoamílico (49:1) y se mezcló. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos.
10. Se obtuvo una fase acuosa y se transfirió a un tubo de reacción eppendorf de 1.5 mL mL con 600 μ L de etanol absoluto.
11. Se Centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. Se decantó.
12. Se agregaron 600 μ L de etanol al 70% y después se agitó. nuevamente se centrifugó a 14000rpm por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante.
13. Se secaron las muestras en el Speed-vac aproximadamente 15 a 20 minutos.
14. Se resuspendió el DNA en H₂O destilada (100-300 μ L). Se incubaron las muestras a 60°C durante 1 hora.
15. Se congelaron a -20°C para su conservación.

-Cuantificación del DNA del banco de muestras

Se utilizó espectrofotometría en un equipo tipo Nanodrop® la cuantificación de las muestras. El equipo fue calibrado de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando un blanco de agua destilada antes de realizar las mediciones. Para una medición se depositó 1 μ L de la muestra en el lector. El espectrofotómetro realizó lecturas a longitudes de onda entre 260nm y 280nm, además se realizaron tres mediciones por muestra para obtener un promedio de la concentración y la pureza.

La lectura a 260nm se realizó para la cuantificación del ADN, ya que el ADN absorbe a esta longitud de onda. Las proteínas absorben a una longitud de onda de 280nm, por lo que esta lectura se realizó para obtener la pureza del DNA, mediante una relación entre la absorbancia de una muestra a 260nm y su absorbancia a 280nm. El resultado de este cociente se consideró con buena pureza en rangos de 1.8 a 2.0. Además, también se determinó la relación 260/230 para determinar si el DNA estaba contaminado con otros compuestos orgánicos o por sales. Este rango se consideró adecuado entre 1.5-1.8.

Al obtener la concentración de la muestra de ADN se realizaron diluciones de las muestras a una concentración de 50ng/μL.

Evaluación de los genes ATXN1, ATXN2 y ATXN3

-Amplificación de regiones de interés por PCR

La región de interés de cada gen se amplificó mediante la técnica molecular de PCR de punto final, empleando oligonucleótidos que flanquearan estas regiones. La secuencia de los oligonucleótidos empleados para cada uno de los genes se presenta en el siguiente cuadro.

Gen	Región	Oligonucleótidos	Tamaño (pb)
ATXN1	Exón 8	REP1: AACTGGAAATGTGGACGTAC REP2: CAACATGGGCAGTCTGAG	212
ATXN2	Exón 1	SCA2 F: TGTATGGGCCCTCACCATGT SCA2 R: ACAGCCCCAGACCCCTCAA	689
ATXN3	Exón 10	MJD52: CCAGTGACTACTTTGATTTCG MJD25: TGGCCTTTCACATGGATGTGAA	202

Reactivos y condiciones para la amplificación por PCR de la región de interés del gen ATXN1.

Reactivo	Concentración	Volumen	Fase	Temperatura	Tiempo	
DNA	50 ng/ μl	5 μl	Desnaturalización inicial	94 °C	15 minutos	30 ciclos
Primer Forward	10 μM/ μl	1 μl	Desnaturalización	94 °C	1 minuto	
Primer Reverse	10 μM/ μl	1 μl	Alineación	56 °C	1 minuto	
Hotstart		10 μl	Extensión	72 °C	2 minutos	
H2O		8 μl	Extensión final	72 °C	5 minutos	
Volumen final		25 μl	Conservación	4 °C	∞	

Reactivos y condiciones para la amplificación por PCR de la región de interés del gen ATXN2.

Reactivo	Concentración	Volumen	Fase	Temperatura	Tiempo	
DNA	50 ng/ μl	5 μl	Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos	35 ciclos
Primer Forward	10 μM/ μl	1 μl	Desnaturalización	94 °C	1 minuto	
Primer Reverse	10 μM/ μl	1 μl	Alineación	62 °C	1 minuto	
Hotstart		10 μl	Extensión	72 °C	1 minuto	
DMSO		2.5 μl	Extensión final	72 °C	5 minutos	
H2O		5.5 μl	Conservación	4 °C	∞	
Volumen final		25 μl				

Reactivos y condiciones para la amplificación por PCR de la región de interés del gen ATXN3.

Reactivo	Concentración	Volumen	Fase	Temperatura	Tiempo	35 ciclos
DNA	50 ng/ μ l	5 μ l	Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos	
Primer Forward	25 μ M/ μ l	1 μ l	Desnaturalización	94 °C	1 minuto	
Primer Reverse	25 μ M/ μ l	1 μ l	Alineación	62 °C	1 minuto	
Hotstart		10 μ l	Extensión	72 °C	1 minuto	
H2O		8 μ l	Extensión final	72 °C	5 minutos	
Volumen final		25 μ l	Conservación	4 °C	∞	

-Resolución de productos de PCR

Para la determinación del tamaño del tamaño esperado de los amplicones de los genes ATXN1, ATXN2 y ATXN3, los productos fueron resueltos en geles de agarosa (2.5 %/TBE 1X) y se corrieron en cámara de electroforesis horizontal a 100 V/ 60 min. Para corroborar el tamaño de los productos se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler® 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific®.

a) Purificación a partir de productos de PCR

Se purificaron los productos de PCR con el estuche comercial QIAquick® PCR purification kit de QIAGEN®, que utiliza columnas de sílice y amortiguadores para la unión, lavado y elusión de los productos de PCR.

1. Se agregaron 5 volúmenes de amortiguador PBI por cada volumen de producto de PCR.
2. Se colocó la columna en un tubo colector, se le agregó la mezcla y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto, después el precipitado se desechó.
3. Para el lavado se agregaron 750 μ L de amortiguador PE y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto.
4. Para descartar cualquier rastro de etanol se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
5. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
6. Para la elución, se agregaron 20 μ L de H2O libre de RNAasas al centro de la columna y se centrifugo a 13 000 rpm por 1 minuto.
7. Los productos de PCR se almacenaron a 4°C para su uso posterior.

b) Purificación a partir de productos de PCR resueltos en geles de agarosa

Este procedimiento se realizó para las muestras que presentaron alelos expandidos y así poder secuenciar ambos alelos de manera independiente. Como paso previo se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa (3%/ TBE 1X) a 120 V/ 90 minutos.

1. Se cortaron los fragmentos de PCR de cada alelo con un escalpelo nuevo, directamente del gel de agarosa en un transiluminador.
2. Se pesaron los fragmentos de gel a un tubo de 1.5 ml.
3. Se agregó amortiguador QG (3 veces el peso de agarosa) 100 mg =100 μ L.
4. La mezcla se incubó a 50 °C x 30 minutos para disolver completamente el gel.
5. Se colocó la columna en un tubo colector y a ésta se le agregaron 700 – 800 μ L de la mezcla y se centrifugaron a 13 000 rpm por 1 minuto, después el precipitado se desechó.

6. Se le agregaron 500 μL de amortiguador QG y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto, se desechó el precipitado.
7. Para el lavado se agregaron 750 μL de amortiguador PE y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto.
8. Para descartar cualquier rastro de etanol se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
9. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
10. Para la elución, se agregaron 20 μL de H₂O libre de RNAsas al centro de la columna y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto.
11. Los productos de PCR se almacenaron a 4 °C.

-Reacción de secuenciación

Para la reacción de secuenciación se empleó el estuche comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems® las concentraciones de los reactivos y los volúmenes se muestran a continuación, así como las condiciones de tiempo y temperatura.

Reactivo	Concentración	Volumen
Primer Forward o Reverse	25 ng/ μl	1 μl
Amortiguador de secuenciación	5X	4 μl
Big Dye®		1 μl
H ₂ O libre de RNAsas		12 μl
Producto de PCR	~100 ng/ μl	2 μl
Volumen final		20 μl

Fase	Temperatura	Tiempo	25 ciclos
Desnaturalización inicial	96 °C	30 segundos	
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	
Alineación	50 °C	10 segundos	
Extensión	60 °C	4 minutos	
Extensión final	72 °C	1 minutos	
Conservación	4 °C	∞	

-Purificación de productos para secuenciación

Para eliminar cualquier exceso de oligonucleótidos y de Big Dye®, se purificaron los productos de secuenciación con columnas de purificación Centri-Sep® de Life Technologies®, con el siguiente procedimiento.

1. Se adicionó un volumen de 750 μL de agua estéril, a una columna Centri-Sep® para hidratarla, después se eliminaron las burbujas.
2. Las columnas se conservaron a temperatura ambiente 30 minutos.
3. Una vez hidratadas se quitaron las tapas de la columna para drenar el líquido y se colocaron en un tubo colector. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto.
4. Se desechó el líquido del tubo colector y se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml.
5. El producto de la reacción de secuenciación se aplicó en el centro de la columna, sin tocar la superficie del gel y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos.
6. El producto purificado se secó en concentrador al vacío sin aplicar calor.

-Secuenciación automatizada

Los productos de secuenciación secos se resuspendieron en formamida ultrapura y se colocaron en una placa de 96 pozos, las muestras se desnaturalizaron a 96 °C / 5 minutos y se analizaron en un secuenciador automatizado ABI PRISM® 3130.

-Análisis de cromatogramas

Para el análisis bioinformático de los cromatogramas obtenidos, se utilizó el software Sequencher V 5.1 Gene Codes®.

Evaluación del gen FXN

-Tamizaje con PCR de triple cebador fluorescente

Para el análisis de las muestras y detección de alelos expandidos en la región flanqueante del repetido GAA del intrón 1 de FXN^{lxvi}, se utilizó la técnica de PCR con triple cebador (TP-PCR), la cual fue desarrollada primeramente por Warner et al^{lxvii}, para la detección de alelos expandidos en distrofia miotónica. El ensayo de PCR utiliza un cebador específico de locus que flanquean la repetición junto con cebadores apareados, amplificando desde múltiples sitios de cebado dentro de la repetición. La especificidad está determinada por la etiqueta fluorescente (tag), específica del locus cebador. TP-PCR genera una escalera característica en la traza de fluorescencia que permite la rápida identificación de repeticiones patógenas de gran tamaño, que no pueden ser amplificadas utilizando únicamente los cebadores flanqueantes.

Las cantidades de cada componente del estuche comercial Tru Allele® de Applied Biosystems utilizado y el programa se muestran a continuación.

Gen	Región	Oligonucleótidos
FXN	Intrón 1	Forward: GGAGGGATCCGTCTGGGCAAAGG Reverse: CAATCCAGGACAGTCAGGGCTTT

Reactivo	Concentración	Volumen	Fase	Temperatura	Tiempo	
DNA	100 ng/ µl	1.5 µl	Desnaturalización inicial	95 °C	12 minutos	10 ciclos
Oligo Forward		1.56 µl	Desnaturalización	94 °C	15 segundos	
Oligo Reverse		0.78 µl	Alineación	55 °C	15 segundos	
Fluoróforo		0.78 µl	Extensión	72 °C	30 segundos	20 ciclos
Allele Premix		7.5 µl	Desnaturalización	89 °C	15 segundos	
H2O		0.38 µl	Alineación	55 °C	15 segundos	
Volumen final		12.5 µl	Extensión	72 °C	30 segundos	
			Extensión final	72 °C	5 minutos	
			Conservación	4 °C	∞	

Al terminar la reacción, se colocaron en una placa de secuenciación de 96 pozos: 9 µL de formamida ultrapura, 1 µL de Marcador de Peso Molecular fluorescente de LIZ 500™ y 2 µL de producto de TP-PCR que se realizó anteriormente. Se mezclaron y se desnaturalizaron las muestras a 96° C por 5 min.

Para el análisis de fragmentos por electroforesis capilar se empleó el secuenciador AB3130 de Applied Biosystems®, y con ayuda del software GeneMapper® 4.0, se realizó un tamizaje rápido en donde se determinó si la muestra presentaba una expansión anormal, de acuerdo al patrón de líneas (ver sección Resultados).

La utilización del software GeneMapper® proporcionó algoritmos avanzados para reconocer y filtrar artefactos químicos de la amplificación, incluidos los picos que son repetitivos o que "tartamudean", diferenciándolos de las repeticiones de microsatélites de diferentes longitudes.

-PCR para fragmentos largos

Se realizó PCR para fragmentos largos (Long PCR) en todos aquellos pacientes con tamizaje positivo para expansión de GAA en el gen FXN, empleando el estuche comercial Invitrogen™ Platinum™ DNA Polymerase. Se realizaron diversas pruebas para ajustar condiciones y concentraciones de los componentes de la reacción. Las temperaturas y tiempos, así como los ciclos se establecieron desde el inicio de las pruebas de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Gen	Región	Oligonucleótidos	Tamaño (pb)
FXN	Intrón 1	Forward (F) : GAAGAACTTTGGATTGGTT Reverse (R) : TTTCCAGAGATGCTGGGAAA	Alelos normales 496 Alelos anormales >496

Reactivos y condiciones para la amplificación por PCR de fragmentos largos de la región de interés del gen FXN.

Reactivo	Concentración	Volumen	Fase	Temperatura	Tiempo	
Agua	-	23.2	Desnaturalización inicial	94 °C	1 minuto	16 ciclos
Buffer con MgCl ₂		5.0	Desnaturalización	94 °C	15 segundos	
Enhancer		5.0	Alineación	68 °C	10 minutos	
MgSO ₄		1.5	Desnaturalización	94 °C	15 segundos	
Desoxirribonucleótidos trifosfato		1.0	Alineación	68 °C	10 minutos	12 ciclos
Oligonucleótido sentido	25 µM/ µl	1.0	Extensión	72 °C	10 minutos	
Oligonucleótido antisentido	25 µM/ µl	1.0	Conservación	4 °C	∞	
DNA polimerasa		0.3				
DNA	50 ng/ µl	38.0				
Volumen final	-	38.0				

-Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

1. Se utilizó como amortiguador de corrida: Buffer SB (borato de sodio).
2. Se utilizó 3.5 µL de un marcador de peso molecular de 1 kb GeneRuler® 1 kb DNA Ladder (10 000 a 250 pb).

3. Colocar en un tubo de 0.6 μL , 5 μL de colorante de carga y 45 μL de PCR.
4. Se corrieron los geles a 130 V por 3 horas (Verificación de amplificación tras 30 minutos aproximadamente).
5. Se fotografiaron los geles.

-Cálculo del número aproximado de repetidos

Para realizar el cálculo aproximado del número de repetidos de GAA, se utilizó un método previamente formulado en nuestro laboratorio (ver recuadro), el cual se basa en el uso de un control positivo como referencia, del que se conoce el número de repetidos exacto determinado previamente por técnica de Southern Blot. A través de un análisis gráfico y de medición milimétrica en el que se compara el tamaño de los productos de PCR larga de los sujetos posibles positivos mediante el tamizaje con fragmentos, se comparan con el amplicón del control positivo.

Método casero de análisis gráfico para el conteo de repetidos GAA

- Los repetidos en el intrón 1 del gen *FXN* corresponden al triplete GAA, cuando no hay alelos expandidos los oligonucleótidos amplifican un producto de 1500 pb.
- De manera que, nuestro control positivo tiene 600 repetidos GAA en un alelo y 1033 repetidos en el otro alelo, por lo tanto tendrá:
 - Alelo 1: $600 \times 3 = 1800$ repetidos + 1500 pb de amplicón base = 3300 pb
 - Alelo 2: $1033 \times 3 = 3099$ repetidos + 1500 pb de amplicón base = 4599 pb.
- Al medir la distancia de acuerdo a la banda que corresponde a 4599 o 3300pb, con los amplicones en estudio se puede establecer una relación.

RESULTADOS

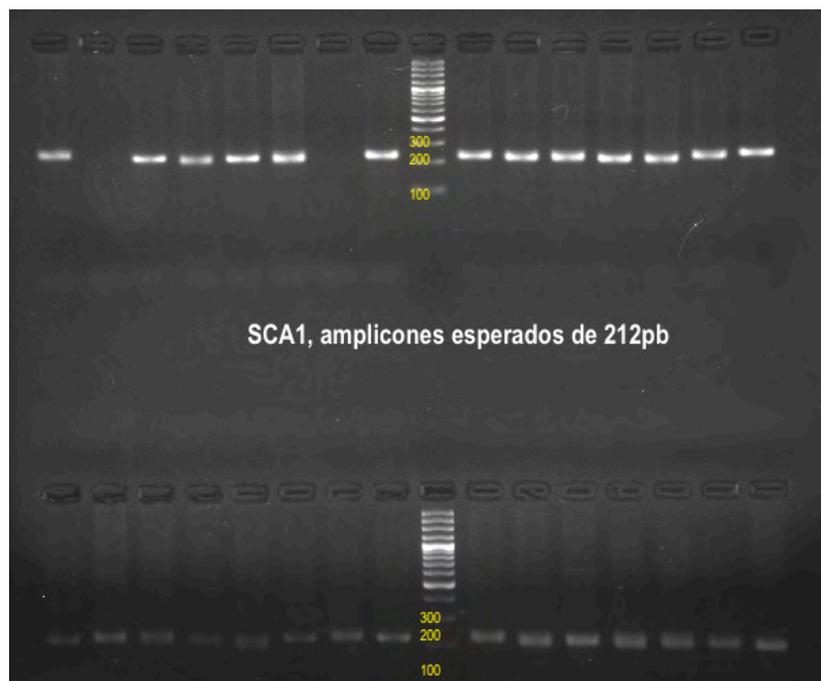
En el registro del departamento de genética del INNN de 1994 a junio del 2015, se contaba con alrededor de 1574 individuos que habían sido evaluados en el gen *HTT* para descartar EH, de los cuales 170 sujetos (10.8%) mostraban un resultado negativo. De estos 170 negativos se contaba con muestra en el banco de DNA, 22 sujetos tuvieron que ser eliminados debido a que no se contaba con suficiente cantidad de DNA para llevar a cabo las evaluaciones o bien el DNA se encontraba degradado. 148 individuos fueron incluidos, de estos el 61.4% (n=91) correspondían a sujetos femeninos. Del total de individuos analizados 103 correspondían a una presentación esporádica, 43 individuos fueron formas familiares correspondientes a 25 familias y 5 individuos fueron considerados como indefinidos ya que no se contaba con mayor información.

Los 148 individuos evaluados mostraban rangos normales de repetidos CAG en el gen *HTT*, la media de repetidos en el primer alelo fue de 17.304 (rangos de 9-25 repetidos), mientras que la media de repetidos CAG en el segundo alelo fue de 20.58 (rangos de 15-26 repetidos).

-Evaluación Molecular

Las muestras analizadas mediante el tamizaje electroforético para *ATXN1* no mostraron dobles bandas que sugieran expansión de alguno de los alelos (**Figura 1**). Debido a que en población mexicana no existen reportes previos del número normal de repetidos CAG en el exón 8 de este gen, se selecciono un 10% del total de las muestras de manera aleatoria para evaluar el número de repetidos mediante secuenciación directa, con ello se logró encontrar que los alelos de repetidos CAG se encuentra en rangos de 24 a 34 repetidos, con una moda de 27 repetidos en los alelos de sujetos de población mexicana, **Tabla 3, Figura 2**.

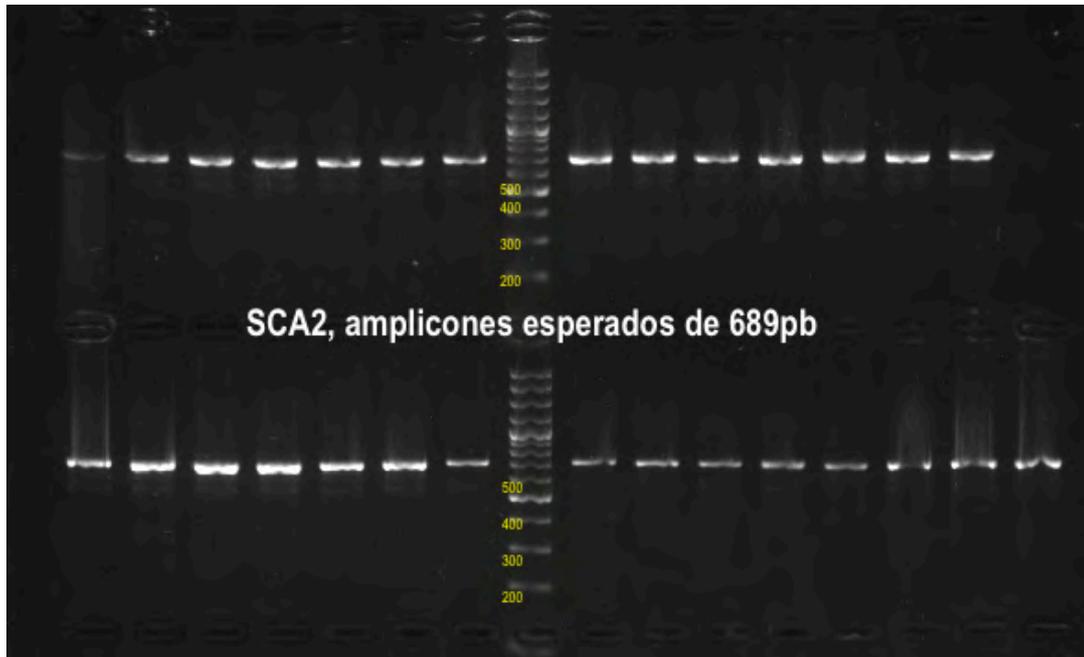
Figura 1. Tamizaje por corrimiento electroforético en *ATXN1*.



Productos de PCR resueltos en geles de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular GeneRuler® de 100 pb.

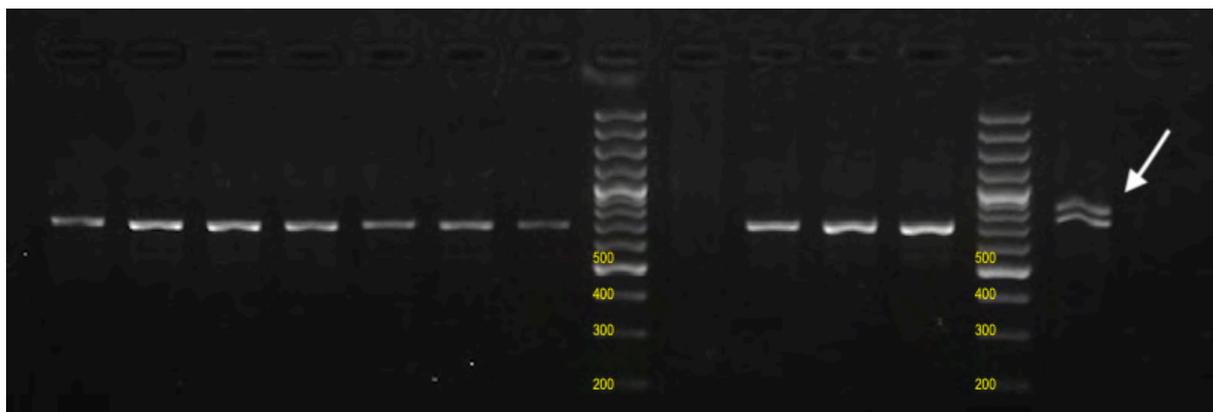
El tamizaje electroforético en el gen ATXN2 mostró un tamaño de amplicón esperado de 689pb en la mayor parte de las muestras analizadas, **Figura 3**. Sin embargo, en 3 muestras de los sujetos analizados se pudo observar una doble banda en el corrimiento electroforético (**Figura 4**), posteriormente estas fueron cortadas, purificadas y secuenciadas, mostrando un rango de repetidos CAG que supera los 33 repetidos en el alelo de mayor peso molecular y corroborándose mutación, **Tabla 4, Figura 5**.

Figura 3. Tamizaje por corrimiento electroforético en ATXN2.



Productos de PCR resueltos en gels de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular GeneRuler® de 100 pb.

Figura 4. Sujeto positivo en el tamizaje por corrimiento electroforético en ATXN2.

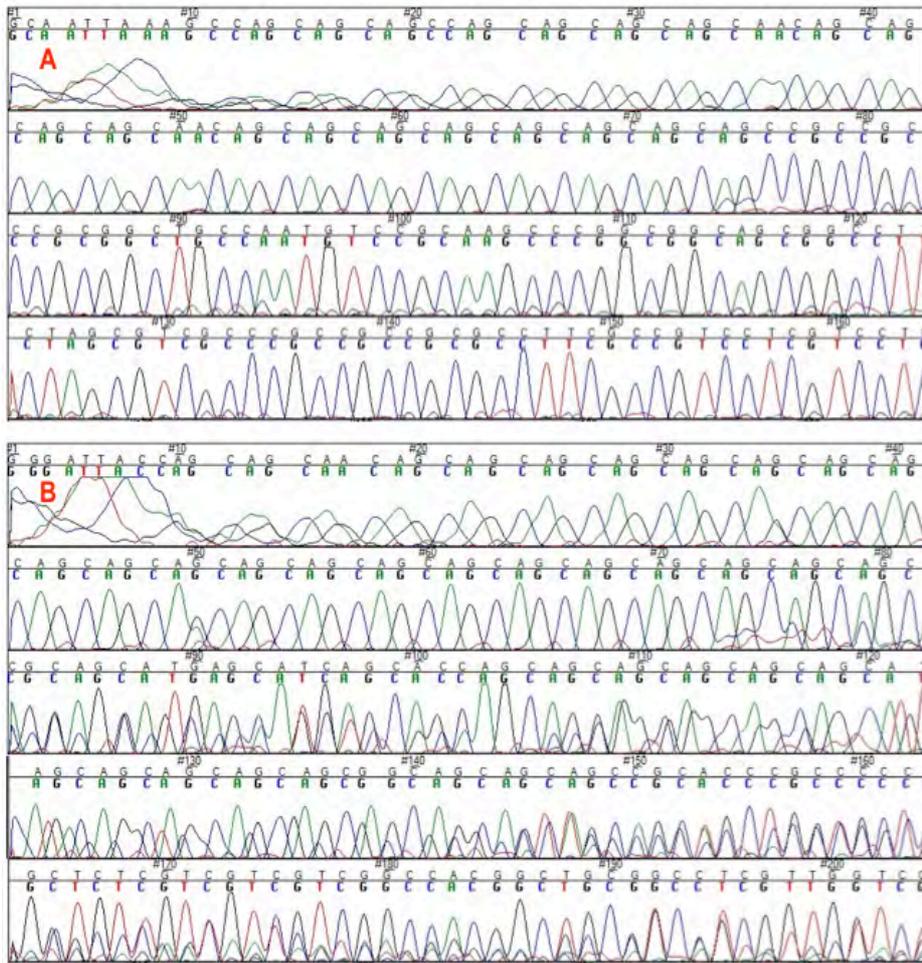


La flecha muestra una doble banda en un mismo carril producida por alelos de diferente peso molecular. Marcador de peso molecular GeneRuler® de 100 pb.

Tabla 4. Análisis de repetidos en ATXN2 mediante secuenciación Sanger.

No.	Sujeto	Alelo 1	Alelo 2	Secuencia de repetidos
1	493	20	49	[CAG(8)CAA CAG(4) CAA CAG(8)], [CAG(37)CAA CAG(4) CAA CAG(8)]
2	680	20	49	[CAG(8)CAA CAG(4) CAA CAG(8)], [CAG(37)CAA CAG(4) CAA CAG(8)]
3	681	20	54	[CAG(8)CAA CAG(4) CAA CAG(8)], [CAG(42)CAA CAG(4) CAA CAG(8)]

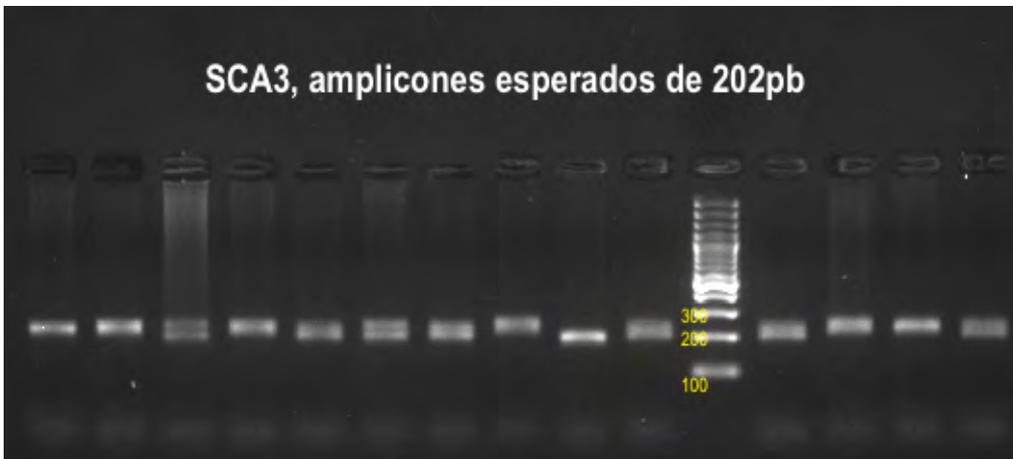
Figura 5. Electroferograma en ATXN2, muestra los 2 alelos del sujeto 493.



A muestra la secuencia del alelo sin mutación. B alelo mutado, se aprecia la superposición de señal de las bases detectadas por la secuenciación debido a una gran cercanía entre cada uno de los alelos cuando fueron cortados y purificados del gel de agarosa.

Las muestras analizadas mediante tamizaje electroforético para ATXN3 no mostraron doubles bandas que sugieran expansión de alguno de los alelos (Figura 6).

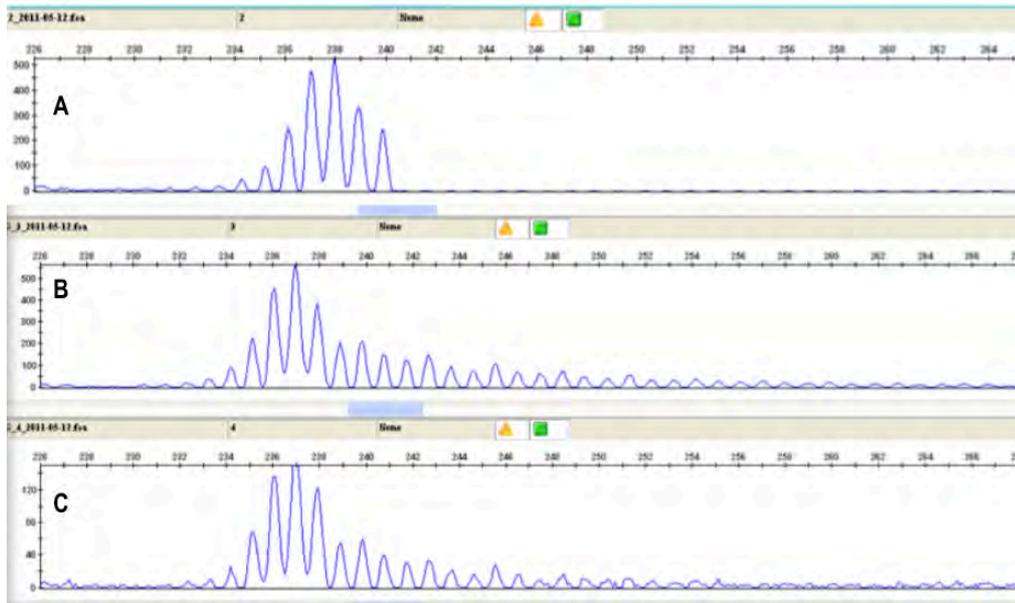
Figura 6. Tamizaje por corrimiento electroforético del gen ATXN3.



Los sujetos analizados mostraron negatividad a una expansión en los productos de PCR resueltos en geles de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular GeneRuler® de 100 pb.

El tamizaje realizado en el gen *FXN* mediante la técnica de análisis de fragmentos mostró un patrón de "tartamudeo" sugestivo de una posible expansión de repetidos GAA en el intrón 1 (Figura 7, Tabla 5). Se realizó PCR-larga para corroborar la posible expansión en los 19 sujetos que resultaron positivos, sin embargo, se descartó una posible expansión a través de este análisis(Figura 8).

Figura 7. Tamizaje por electroforesis capilar del gen *FXN*.

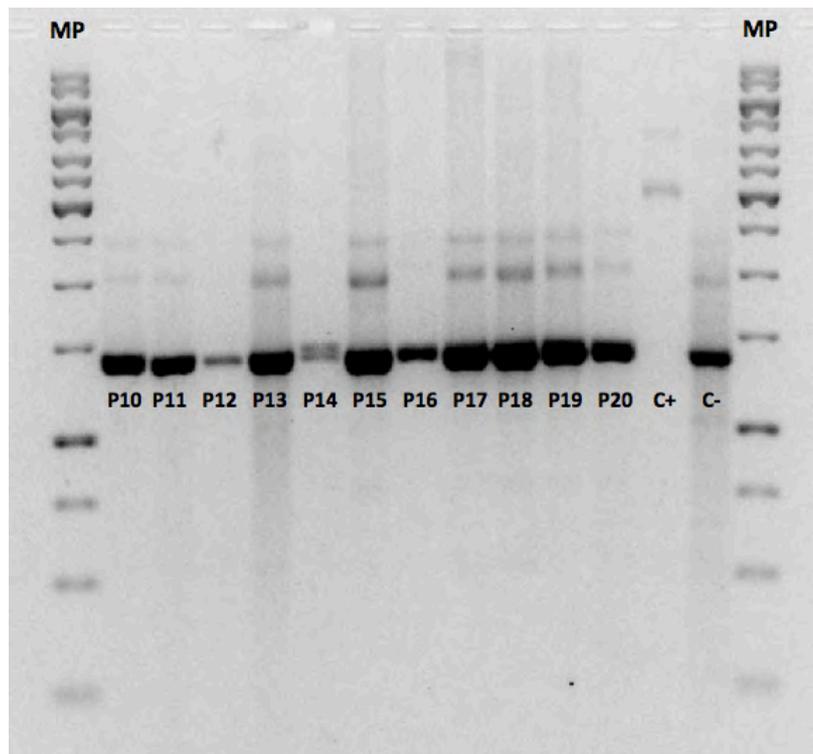


Electroferogramas obtenidos por análisis de fragmentos, por medio del software GeneMapper® 4.0. A muestra una expansión te tamaño normal, mostrando un patrón de líneas en un solo punto. B y C son positivas, muestra expansión del repetido, en cual se observa una serie de picos continuos o también llamado "tartamudeo".

Tabla 5. Sujetos positivos al tamizaje por análisis de fragmentos en *FXN*.

No.	Sujeto	Análisis de fragmentos
1	155	+
2	367	+
3	403	+
4	460	+
5	462	+
6	463	+
7	484	+
8	677	+
9	725	+
10	726	+
11	756	+
12	916	+
13	917	+
14	1076	+
15	1083	+
16	1192	+
17	1194	+
18	1293	+
19	1321	+
20	1507	+

Figura 8. PCR larga para determinar expansiones en el gen *FXN*.



Resolución de los productos en gel de agarosa por medio del protocolo de PCR larga flanqueados por un marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder. MP, Marcador de peso; P, Paciente; C+, Control positivo; C-, control negativo.

-Evaluación Clínica

Tres sujetos considerados como posibles fenocopias de la enfermedad de Huntington, resultaron con mutación en el gen *ATXN2*, todos ellos correspondían al sexo femenino con rangos en la edad de inicio de 15-19 años, una de ellas falleció tras 10 años de progresión del padecimiento. No fue posible re-contactar a estos pacientes por lo que no pudo realizarse la escala UHDRS, a continuación se resumen los datos clínicos más sobresalientes de tales individuos.

Sujeto 493

Femenino de 19 años (en el año 1999), que a los 14 años inicio con movimientos mioclónicos, inestabilidad de la marcha, leve disartria, su evaluación neuropsicológica mostraba un coeficiente intelectual de 63 puntos y con datos de deterioro progresivo. La paciente se había embarazado en 3 ocasiones, tuvo un óbito a los 5 meses y 2 muertes neonatales durante las primeras horas de vida. Su madre inicio a los 38 años con rigidez muscular, inestabilidad de la marcha, temblor generalizado, disartria y demencia, no se realizaron evaluaciones medicas y falleció a los 42 años; además diversos miembros por rama materna finados por manifestaciones clínicas similares. La edad de presentación con un aparente efecto de anticipación y el gran deterioro cognitivo sustentaron la evaluación en *HTT* con resultado en rangos normales.

Sujeto 680

Femenino, hermana del sujeto 681, a la edad de 19 años (en el año 1995) comenzó con somnolencia, dificultad para deambular, deterioro cognitivo, movimientos coreiformes, a través del tiempo con mayor deterioro en las capacidades de autocuidado, disartria, ataxia y demencia. Antecedente de madre finada a los 41 años con un cuadro de alteración en el movimiento no especificado y demencia.

Sujeto 681

Femenino que a la edad de 15 años (en el año 1992) comienza con lentitud en el movimiento, inestabilidad de la marcha, disartria, limitación de las capacidades de autocuidado (comer, peinarse, bañarse), posteriormente se instaura temblor generalizado, ataxia, disminución de la fuerza muscular, espasticidad, hiperreflexia; perdida ponderal, desorientación, deterioro cognitivo, pérdida del control de esfínteres, ansiedad, alucinaciones visuales y auditivas, así como miedo, llanto fácil y gritos paroxísticos. No fue posible llevar seguimiento de su evaluación en el INNN debido a que eran derechohabientes de otra institución y falleció en 2002 a los 25 años. De acuerdo a los antecedentes de afección en la madre quien cursó con demencia, los movimientos coreiformes de la hermana y el deterioro cognitivo en ambas, sustentaron la evaluación en *HTT* la cual resulto negativo.

DISCUSIÓN

Se había descrito originalmente que la frecuencia de una prueba negativa ante la sospecha de un cuadro compatible de EH correspondía a 1%^{lviii}, sin embargo, diferentes series en diversas poblaciones han contrastado este hecho casi desde el descubrimiento de la mutación causal de la EH. Por ejemplo, Andrew et al.^{lxviii} en 1994 en Vancouver, Canadá; describieron una cohorte de 1,022 individuos evaluados en *HTT*, en la que 30 sujetos (2.9%) mostraron una prueba negativa. En otro ejemplo, Castilhos et al.^{lx} en Brasil describieron una muestra de 104 casos índices que mostraban un fenotipo compatible con EH, encontrando una prueba positiva para la mutación de *HTT* en 93 individuos (89.4%) y negatividad en el restante 10.6%. En nuestro estudio, de un total de 1574 individuos previamente analizados para el gen *HTT*, se encontró una frecuencia de 10.8% casos negativos a la prueba, lo que confirma una discrepancia importante con el dato original.

Del registro de sujetos con prueba negativa en *HTT* (n=170), sólo en 148 se pudo llevar a cabo las evaluaciones moleculares propuestas. Todos los individuos que se incluyeron mostraron rangos de alelos menores a 26 repetidos (en un primer alelo con una media de 17.304 -rangos de 9-25-, segundo alelo una media de 20.58 -rangos de 15-26-). Este dato cobra relevancia, ya que desde el año 2007, comenzaron a reportarse casos de pacientes con un fenotipo similar al de EH en portadores de alelos intermedios en el gen *HTT*.^{lxix lxx lxxi lxxii lxxiii} Un estudio previo realizado por el autor de este documento (tesis de alta especialidad en Neurogenética, UNAM) se evaluaron a individuos de población mexicana que habían resultado con una expansión de AI en la prueba molecular para descartar EH, todos estos individuos en su evaluación clínica mostraron un trastorno del movimiento y alteraciones psiquiátricas.

Además, como ya se ha expuesto, existen diversas patologías descritas que pueden manifestarse con un fenotipo similar a la EH, el estudio de los genes causales de SCAs en fenocopias de EH, se ha sustentado a través de diversas series y casos aislados a través del paso del tiempo^{xlx}. Dentro de estas posibilidades la SCA1, de la cual no existen reportes de casos confirmados en México^{lxii}, y es con la que con menor frecuencia se ha asociado como causa de fenocopias de EH, en nuestra población no se habían descrito previamente los rangos de repetidos CAG de este gen, a través de la evaluación de un 10% de las muestras, seleccionadas de manera aleatoria de los sujetos del estudio, se trató de evaluar el tamaño del alelo normal en estos pacientes, se encontraron rangos de 24 a 34 repetidos, con una moda de 27, estos hallazgos son compatibles con lo descrito por Goldfarb et al.^{lxxiv} quienes describen rangos normales entre 25 a 37 repetidos CAG.

En la evaluación del gen *ATXN2*, causa etiológica de la SCA2, se encontraron mutaciones en las muestras de 3 sujetos (2%), correspondientes a 2 formas familiares. El historial clínico de estos sujetos, mostró que todos eran del sexo femenino, con una edad de inicio con rangos de 15-19 años y una de ellas falleció tras 10 años de progresión de la enfermedad. El deterioro cognitivo fue el dato clínico primordial que al parecer mantuvo la sospecha para descartar EH, lo cual no es un dato infrecuente en la constelación de manifestaciones de la SCA2, ya que puede presentarse hasta en un cuarto de los casos^{lxxv lxxvi}. Por otro lado, uno de los sujetos con prueba positiva en *ATXN2* manifestó movimientos coreiformes y deterioro cognitivo, su hermana mostró datos de ataxia, rigidez y deterioro cognitivo de inicio muy temprano, lo cual mantuvo la sospecha de EH. En este contexto la corea es una manifestación extracerebelar típica en SCA17 y DRLPA, sin embargo, suele ser un dato infrecuente en el resto de las SCAs; en una serie brasileña descrita en 2014 por Moro et al.^{lxxvii} en la que se pretendió evaluar trastornos del

movimiento asociados a las SCAs (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y SCA10) se encontró que las distonias es el principal desorden del movimiento (después de la ataxia) asociado a estas entidades, y no se encontró ningún caso de corea asociado a SCA2 o alguna de las ataxias evaluadas. Sin embargo, el panorama se modifica cuando lo que se evalúa es a pacientes con un cuadro de corea con ataxia o un fenotipo sugestivo de EH con prueba negativa en *HTT*, ya que de esa manera si ha sido posible encontrar positividad para la mutación en *ATXN2*^{xlx lxxviii}, y llegando a describirse como la segunda causa más frecuente de fenocopias de la EH.^{lx} En México la SCA2 es la causa más frecuente de ataxia espinocerebelosa autosómico dominante, llegando a ser casi el 50% de los casos y que en nuestra población la hace distintiva del resto del mundo, por lo que resulta relevante considerarla como una posible causa de fenocopias de la EH, ya que esta entidad puede mostrar una expansión del fenotipo^{lxxix}.

No se encontraron mutaciones en el gen *ATXN3*, así como tampoco en el gen *FXN*. En este último durante el tamizaje para posibles expansiones con la técnica de análisis de fragmentos, se encontró positividad en 20 individuos, pero el corrimiento electroforético para PCR de fragmentos largos descartó una expansión. Sin embargo, esta posible positividad podría deberse a la presencia de un alelo del tipo largo normal o premutado, lo cual no es posible evaluar mediante la PCR de fragmentos largos y requeriría la realización de una técnica como el Southern Blot para especificar el número de repetidos en estos sujetos.

Desde 1994, el departamento de genética del INNN inicio el montaje de la técnica para la evaluación de EH, brindando este servicio a la comunidad médica y la población mexicana, nuestro equipo de trabajo inició un primer abordaje en 102 sujetos con muestras negativas a *HTT*, donde se evaluaron los genes para *PRPN*, *JPH3*, *TBP*, *ATN1* y *FTL* (datos en proceso de publicación), donde se logró determinar la causa en 8.8% de los casos, de los cuales el 83% (8 casos) mostraron una alteración en el gen *JPH3* y en un 17% (1 caso) mostró alteración en el gen *TBP*. Nuestro estudio incluyo aquellos sujetos con evaluaciones negativas a estos genes y casos nuevos negativos a *HTT*, de acuerdo a estos hallazgos corroboramos que las mutaciones en *ATXN2* corresponderían a la segunda causa más frecuente de fenocopias de la EH en esta muestra de población mexicana, como lo describió Castilhos et al.^{lx} Por otro lado, durante el desarrollo de este trabajo, 57 nuevas muestras de los 148 individuos requieren la evaluación de los genes analizados en el primer abordaje, para descartar mutaciones en estos genes.

Un importante número de casos negativos al estudio molecular realizado pero con un fenotipo similar, nos sugiere la existencia de otros genes pudieran presentar el fenotipo similar a la EH. Surge la necesidad de estudiar a estas entidades y tratar de consolidar indicadores clínicos, epidemiológicos, bioquímicos, clinimétricos o imagenológicos que la ayuden a diferenciar y faciliten su diagnóstico así como posibles riesgos de recurrencia.

CONCLUSIONES

Las mutaciones en el gen *ATXN2* representan la causa más frecuente de fenocopias de la EH en pacientes mexicanos respecto a los genes analizados en este estudio y son la segunda causa más frecuente de fenocopias de la EH en población mexicana. Dado que la SCA2 es la principal causa de ataxia en nuestro país, frente a las formas de ataxia asociadas a corea o los fenotipos similares a EH con prueba negativa en *HTT* debería tomarse en consideración la posible evaluación en este gen.

El conocimiento de la distribución de las mutaciones en fenocopias de la EH es útil como una referencia para nuestra población, lo cual permitirá facilitar el diagnóstico de futuros pacientes al seguir un algoritmo basado en las mutaciones encontradas en esta muestra de población mexicana estudiada.

El resto de los casos tanto de formas familiares y esporádicos en donde no se encontró ninguna variante genética en los genes estudiados, abre la posibilidad de otros genes aún desconocidos estén participando en presentación de estos fenotipos similares a EH.

LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

En este estudio una limitante fue la calidad y disponibilidad de las muestras, así como la carencia de datos clínicos concretos debido al tiempo que ha transcurrido desde su primera evaluación con la prueba molecular de EH y la disponibilidad de pruebas moleculares diferentes a *HTT*. Muchos de estos individuos abandonan su seguimiento en la institución o han fallecido antes de haberles podido ofrecer esta prueba, lo cual limitó su evaluación clínicométrica.

Actualmente este abordaje nos permitirá identificar y caracterizar como se distribuyen estos genes en nuestra población como causantes de fenocopias de EH. Es necesario realizar estudios que nos permitirán la evaluación de nuevos genes candidato como causales de formas familiares por otras metodologías, así como la posibilidad de realizar evaluaciones genómicas como el estudio de exoma en formas esporádicas.

ANEXOS



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA "MVS"
DEPTO. DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CONSENTIMIENTO INFORMADO PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

FECHA: ____/____/____

"Búsqueda de asociación entre manifestaciones clínicas de fenocopias de la enfermedad de Huntington y mutaciones en los genes *TBP, ATN1, JPH3, PRNP, FTL, ATXN1, ATXN2, ATXN3, FXN, PANK2* y *C9ORF72*

1. He sido informado/a que en el departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se está realizando una investigación para saber si los pacientes negativos al estudio molecular de enfermedad de Huntington (EH), pueden tener mutaciones en otros genes causales de su cuadro clínico.
2. Las evaluaciones a realizar en el presente proyecto son: *escala unificada de rangos para enfermedad de Huntington (UHDRS)*, así como toma de muestra de sangre periférica para la evaluación de los genes *TBP, ATN1, JPH3, PRNP, FTL, ATXN1, ATXN2, ATXN3, FXN, PANK2* y *C9ORF72*.
3. He sido informado/a que si acepto participar en este estudio se me tomará una muestra de sangre periférica de 10 ml., de la cual se extraerá mi DNA que es el material hereditario con la finalidad de evaluar los genes antes mencionados y que se conocen como generadores de un cuadro clínico similar a la EH.
4. He sido informado/a que mi participación en el estudio es **VOLUNTARIA** y que si no acepto participar, no se afectará mi tratamiento y seguimiento en el Instituto.
5. He sido informado/a que mi participación en el estudio no representa ningún costo para mí.
6. He sido informado/a que no recibiré remuneración económica por participar en este estudio.
7. He sido informado/a que puedo abandonar el estudio en el momento que yo lo desee.
8. He sido informado que mi DNA se usará para esta investigación y para otras en las que se están analizando genes de la población mexicana.
9. He leído esta carta cuidadosamente y he decidido participar libre y voluntariamente en el estudio.
10. Para cualquier duda o aclaración sobre este estudio puede comunicarse con las personas responsables de esta investigación el Dr. Miguel Ángel Ramírez García y la Dra. Petra Yescas G. al teléfono 56 06 38 22 Ext. 2016 ó 2002, respectivamente. También se puede dirigir con el Dr. Antonio Torres Ruiz, presidente del Comité de Bioética de nuestro Instituto a la extensión 5027.

Nombre del paciente ó familiar _____

Dirección _____

Teléfono _____

Responsable legal _____ Firma _____

Parentesco _____

Nombre y firma del 1er. testigo _____

Nombre y firma del 2º testigo _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento _____

Firma _____

REFERENCIAS

- i Abdo WF, van de Warrenburg BP, Burn DJ, Quinn NP, Bloem BR. The clinical approach to movement disorders. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(1):29-37.
- ii Walker RH. Chorea. *Continuum*. 2013:1242-1263.
- iii Walker RH. Introduction: an approach to the patient with chorea. In: Walker RH, editor. *The differential diagnosis of chorea*. Oxford: Oxford University Press; 2010.
- iv Burgunder JM. Genetics of Huntington's disease and related disorders. *Drug Discov Today*. 2014;19(7):985-989.
- v Roos R. Huntington Disease: A Clinical Review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010; 5: 40-48.
- vi Semaka A, Kay C, Doty CN, Collins JA, Tam N, et al. High Frequency of Intermediate Alleles on Huntington Disease-Associated Haplotypes in British Columbia's General Population. *Am J Med Genet Part B*, 2013:864–871.
- vii The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. ACMG/ASHG statement: laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1243-1247.
- viii Schneider SA, Walker RH, Bhatia KP. The Huntington's disease-like syndromes: what to consider in patients with a negative Huntington's disease gene test. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3:517–525.
- ix Harper PS. The epidemiology of Huntington disease. In: Bates G, Harper P, Jones L, editors. *Huntington's disease*. Oxford: Oxford University Press. 2002:159–197.
- x Alonso ME, Ochoa A, Boll MC, Sosa AL, Yescas P, López M, Macias R, Familiar I, Rasmussen A. Clinical and genetic characteristics of Mexican Huntington's disease patients. *Mov Disord*. 2009; 24:2012-2015.
- xi Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 2011;10:83–98.
- xii Codori AM, Slavney PR, Rosenblantt A, Brandt J. Prevalence of major depression one year after predictive testing for Huntington disease. *Genetic testing* 2004;8(2):114-119.
- xiii Quarrell OWJ, Brewer HM, Squiteri F, Barker RA, Nance MA, Landwehrmeyer B: *Juvenile Huntington's disease*. Oxford University Press; 2009.
- xiv Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007 20;369(9557):218-228.
- xv Huntington Study Group. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and-consistency. *Mov Disord* 1996;11:136–142.
- xvi Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington disease. *The American journal of psychiatry* 2005;162(4):725-31.
- xvii Gövert F, Schneider SA. Huntington's disease and Huntington's disease-like syndromes: an overview. *Curr Opin Neurol*. 2013;26(4):420-7.
- xviii Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, et al. Huntington disease without CAG expansion: phenocopies or errors in assignment? *Am J Hum Genet* 1994; 54:852 – 863.
- xix Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, et al. A Worldwide Study of the Huntington's Disease Mutation: the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* 1994; 330:1401–1406.
- xx Wild EJ, Tabrizi SJ. Huntington's disease phenocopy syndromes. *Curr Opin Neurol*. 2007;20(6):681-7.
- xxi Moore RC, et al. Huntington disease phenocopy is a familial prion disease. *Am J Hum Genet*. 2001;69: 1385–1388.
- xxii Stevanin G, et al. Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain*. 2003;126: 1599–1603.
- xxiii Seixas AI, Holmes SE, Takeshima H, Pavlovich A, Sachs N, Pruitt JL, Silveira I, Ross CA, Margolis RL, Rudnicki DD. Loss of junctophilin-3 contributes to Huntington disease-like 2 pathogenesis. *Ann Neurol*. 2012; 71(2):245-257.
- xxiv Greenstein PE, Vonsattel JPG, Margolis, et al. Huntington's Disease Like-2 Neuropathology. *Mov Dis*. 2007; 22 (10): 1416-1423.
- xxv Al-Tahan AY, Divakaran MP, Kambouris M. A novel autosomal recessive "Huntington's disease-like" neurodegenerative disorder in a Saudi family. *Saudi Med J*. 1999; 20: 85-89.
- xxvi Kambouris M, Bohlega S, Al-Tahan A. et al. Localization of the gene for a novel autosomal recessive neurodegenerative Huntington-like disorder to 4p15.3. *Am Hum Genet*. 2000; 66: 445-452.
- xxvii Bauer P, et al. (2004) Trinucleotide repeat expansion in SCA17/TBP in white patients with Huntington's disease-like phenotype. *J Med Genet* 41: 230–232.
- xxviii Bech S, Petersen T, Norremolle A, et al. Huntington's disease-like and ataxia syndromes: Identification of family with a de novo SCA17/TBP mutation. *Parkinsonism and Related Dis*. 2010;16:12-15.
- xxix Bader B, Danek A, Walker RH. Chorea-acanthocytosis. In: Walker RH, ed. *The Differential Diagnosis of Chorea*. Chap 6. Oxford, UK: Oxford University Press; 2010:122-48.
- xxx Walker RH, Jung HH, Dobson-Stone C, Rampoldi L, Sano A, et al. Neurologic phenotypes associated with acanthocytosis. *Neurology*. 2007;68:92–98.

- xxxvi Velayos BA, Dobson-Stone C, Rampoldi L, Bader B, Walker RH, et al. Chorea-acanthocytosis. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. SourceGeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. (consultado en julio 2015)
- xxxvii Nagafuchi S et al. Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet.* 1994;8: 177–182.
- xxxviii Martins S, Matamá T, Guimaraes L, et al. Portuguese families with dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) share a common haplotype of Asian origin. *European J Hum Genet.* 2003; 11: 808-811.
- xxxix Veneziano L, Mantuano E, Catalli, et al. A shared haplotype for dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) in Italian families testifies of the recent introduction of the mutation. *J Hum Genet.* 2014; 59: 153-157.
- xl Hayflick SJ, Westaway SK, Levinson B, et al. Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 33–40.
- xli Hartig MB, Hortnagel K, Garavaglia B, et al. Genotypic and phenotypic spectrum of PANK2 mutations in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation. *Ann Neurol.* 2006;59: 248–256.
- xlii Grimes DA, et al. Late adult onset chorea with typical pathology of Hallervorden-Spatz syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;69: 392–395.
- xliiii Chinnery PF, Crompton DE, Birchall D, et al. The clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTL1 460insA mutation. *Brain.* 2007;130: 110–119.
- xliiii Curtis AR, Fey C, Morris CM, et al. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult onset basal ganglia disease. *Nat Genet.* 2001;28: 350–354.
- xliv Vidal R, Ghetti B, Takao M, et al. Intracellular ferritin accumulation in neuronal and extra-neuronal tissues characterises a neurodegenerative disorder associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene. *J Neuropath Exp Neurol.* 2004;63: 363–380.
- xlv Wild EJ, Mudanohwo EE, Sweeney MG, Schneider SA, Beck J, Bhatia KP, Rossor MN, Davis MB, Tabrizi SJ. Huntington's disease phenocopies are clinically and genetically heterogeneous. *Mov Disord.* 2008;23:716-720.
- xlvii Zhu D, Burke C, Leslie A, Nicholson GA. Friedreich's ataxia with chorea and myoclonus caused by a compound heterozygosity for a novel deletion and the trinucleotide GAA expansion. *Mov Disord.* 2002;17(3):585-589.
- xlviii Tan EK, Ashizawa T. Genetic testing in spinocerebellar ataxias: defining a clinical role. *Arch Neurol.* 2001;58(2):191-195.
- xlix Montermini L, Andermann E, Labuda M, Richter A, Pandolfo M, et al. The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1261-1266.
- l Santos R, Lefevre S, Sliwa D, Seguin A, Camadro JM, Lesuisse E. Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(5):651-690.
- lii Salvado M, Boronat-Guerrero S, Hernández-Vara J, Álvarez-Sabin J. Chorea due to TITF1/NKX2-1 mutation: phenotypical description and therapeutic response in a family. *Rev Neurol.* 2013;56(10):515-520.
- liiii Gras D, Jonard L, Roze E, Chantot-Bastaraud S, Koht J, Motte J, Rodriguez D, Louha M, Caubel I, Kemlin I, Lion-François L, Goizet C, Guillot L, Moutard ML, Epaud R, Héron B, Charles P, Tallot M, Camuzat A, Durr A, Polak M, Devos D, Sanlaville D, Vuillaume I, Billette de Villemeur T, Vidailhet M, Doummar D. Benign hereditary chorea: phenotype, prognosis, therapeutic outcome and long term follow-up in a large series with new mutations in the TITF1/NKX2-1 gene. *Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(10):956-962.
- liiii Friedland RP, Shah JJ, Farrer LA, et al. Behavioral variant frontotemporal lobar degeneration with amyotrophic lateral sclerosis with a chromosome 9p21 hexanucleotide repeat. *Front Neurol* 2012;3:136.
- liiii Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics* 2013;29:499–503.
- li Beck J, Poulter M, Hensman D, et al. Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am J Hum Genet* 2013;92:345–353.
- lii Hensman-Moss DJ, Poulter M, Beck J, Hehir J, Polke JM, et al. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies. *Neurology.* 2014 Jan 28;82(4):292-299.
- lii Kostić VS, Dobričić V, Stanković I, Ralić V, Stefanova E. C9orf72 expansion as a possible genetic cause of Huntington disease phenocopy syndrome. *J Neurol.* 2014.
- liiii Koutsis G, Karadima G, Kartanou C, Kladi A, Panas M. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions are a frequent cause of Huntington disease phenocopies in the Greek population. *Neurobiol Aging.* 2015;36(1):547.
- liiii Pedroso JL, de Freitas ME, Albuquerque MV, Saraiva-Pereira ML, et al. Should spinocerebellar ataxias be included in the differential diagnosis for Huntington's disease-like syndromes? *J Neurol Sci.* 2014 Dec 15;347(1-2):356-358.
- liiii Martino D, Stamelou M, Bhatia KP. The differential diagnosis of Huntington's disease-like syndromes: 'red flags' for the clinician. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013 Jun;84(6):650-656.

-
- lvi Whaley NR, Fujioka S, Wszolek ZK. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: a review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:33.
- lvii Namekawa M, Takiyama Y, Ando Y, et al. Choreiform movements in spinocerebellar ataxia type 1. *J Neurol Sci*. 2001;187:103–106.
- lviii Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, et al. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet*. 1997;60:842–850.
- lix Rottnek M, Riggio S, Byne W, et al. Schizophrenia in a patient with spinocerebellar ataxia 2: coincidence of two disorders or a neurodegenerative disease presenting with psychosis? *Am J Psychiatry*. 2008;165:964–967.
- lx Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, Treiman LJ, Pulst SM: The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *American Journal of Human Genetics*. 1997;60:842-850.
- lxi Durr A: Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 2010;9: 885–894.
- lxii Costa Mdo C, Teixeira-Castro A, Constante M, Magalhães M, Magalhães P, et al. Exclusion of mutations in the PRNP, JPH3, TBP, ATN1, CREBBP, POU3F2 and FTL genes as a cause of disease in Portuguese patients with a Huntington-like phenotype. *J Hum Genet*. 2006;51(8):645-51.
- lxiii Keckarević M, Savić D, Svetel M, Kostić V, Vukosavić S, Romac S. Yugoslav HD phenocopies analyzed on the presence of mutations in PrP, ferritin, and Jp-3 genes. *Int J Neurosci*. 2005 Feb;115(2):299-301.
- lxiv Rodrigues GR, Walker RH, Bader B, Danek A, Brice A, Cazeneuve C, Russaouen O, Lopes-Cendes I, Marques Jr W, Tumas V. Clinical and genetic analysis of 29 Brazilian patients with Huntington's disease-like phenotype. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011 Jun;69(3):419-423.
- lxv Castilhos RM, Souza AF, Furtado GV, Gheno TC, Silva AL, et al. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clin Genet*. 2014 ;86(4):373-377.
- lxvi Ciotti P, Di Maria E, Bellone E, Ajmar F, Mandich P, et al. Triplet repeat primed PCR (TP PCR) in molecular diagnostic testing for Friedreich ataxia. *Mol Diagn*. 2004; 6(4):285-289.
- lxvii Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, et al. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*. 1996; 33(12): 1022–1026.
- lxviii Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Squitieri F, Theilmann J, et al. Huntington Disease without CAG Expansion: Phenocopies or Errors in Assignment? *Am J Hum Genet*. 1994; 54(5): 852–863.
- lxix Kenney C, Powell S, Jankovic J. Autopsy-proven Huntington's disease with 29 trinucleotide repeats. *Mov Disord* 2007;22:127–130.
- lxx Andrich J, Arning L, Wieczorek S, Kraus PH, Gold R, et al. Huntington's disease as caused by 34 CAG repeats. *Mov Disord* 2008; 23: 879–881.
- lxxi Herishanu YO, Parvari R, Pollack Y, Shelef I, Marom B, et al. Huntington disease in subjects from an Israeli Karaite community carrying alleles of intermediate and expanded CAG repeats in the HTT gene: Huntington disease or phenocopy? *J Neurol Sci* 2009; 277:143–146.
- lxxii Ha AD, Jankovic J. Exploring the correlates of intermediate CAG repeats in Huntington disease. *Postgrad Med* 2011;123:116–121.
- lxxiii Groen JL, de Bie RM, Foncke EM, Roos RA, Leenders KL, et al. Late-onset Huntington disease with intermediate CAG repeats: true or false? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81: 228–230.
- lxxiv Goldfarb LG, Vasconcelos O, Platonov FA, Lunkes A, Kipnis V, et al. Unstable triplet repeat and phenotypic variability of spinocerebellar ataxia type 1. *Ann Neurol*. 1996; 39(4):500-506.
- lxxv Bürk K, Globas C, Bösch S, Gräber S, Abele M, et al. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia 2. *Brain*. 1999; 122(4):769-777.
- lxxvi Jianhua Ma, Chuanjia Wu, Jing Lei, Xiaoning Zhang. Cognitive impairments in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3 are positively correlated to the clinical severity of ataxia symptoms. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(12): 5765–5771.
- lxxvii Moro A1, Munhoz RP, Moscovich M, Arruda WO, Raskin S, Teive HA. Movement disorders in spinocerebellar ataxias in a cohort of Brazilian patients. *Eur Neurol*. 2014;72(5-6):360-362.
- lxxviii Schmitz-Hübsch T, Coudert M, Bauer P, Giunti P, Globas C, Baliko L, et al. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology* 2008;71:982–989.
- lxxix Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, Mader C, Ochoa A, et al. Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord*. 2007; 22(7):1050-1053.