



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

**ORIGEN ANCESTRAL DE PACIENTES MEXICANOS CON EL
FENOTIPO 2 SIMILAR A LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. EN C. PETRA YESCAS GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

COMITÉ TUTOR:

DR. ERWIN CHIQUETE ANAYA, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. CARLOS SABAS CRUZ FUENTES, INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
DRA. ANA LUISA SOSA ORTIZ, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ, INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA CONDE DE VALENCIANA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2023.



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.

DEDICATORIA

A mis padres Elizabeth y Miguel Ángel, la virtud y el significado de ser una buena persona se los debo a ellos.

A mis hermanas, mis sobrinos y mi familia que me han apoyado siempre.

A todos mis amigos que son mi familia elegida.

A mis amigos y compañeros del INNN: Dr. Jara, Dr. George, Adri, Lety, David y Dra. Nancy, su confianza en mi trabajo ha sido muy importante para mi crecimiento.

A mi tutora la Dra. Petra Yescas Gómez, quien ha confiado en mí y me ha brindado todo su apoyo, su amistad y las herramientas para crecer en el campo científico-académico.

A mi co-tutora la Dra. Sandra Romero Hidalgo, su apoyo y su constante supervisión fueron claves para los frutos de este proyecto y siempre agradeceré el guiarme en el vasto y complejo mundo de la genómica computacional.

A las lamentables pérdidas durante el proceso de esta tesis: la hermana de mi tutora, la madre de mi co-tutora y la de mi padre, a todos ellos un extenso abrazo al infinito.

Por último, a mis mascotas: Hunter, Selma y Appa que me ayudaron a disipar los momentos de malestar y de ansiedad con su abnegada cercanía.

INDICE

RESUMEN	5
Palabras clave	6
CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA INVESTIGACIÓN	7
ANTECEDENTES	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
JUSTIFICACIÓN	27
METODOLOGÍA	28
a) Diseño del estudio	
b) Población y muestra	
c) Criterios de selección	
-Criterios de inclusión	
-Criterios de eliminación	
d) Definición y clasificación de variables	
e) Plan de análisis estadístico	
PROCEDIMIENTOS	32
1. Evaluación clínica	
2. Evaluación molecular	
Muestra biológica	
Extracción de DNA	
Cuantificación y análisis de integridad del ADN	
2.1 Evaluación del gen <i>JPH3</i>	34
-Resolución de productos de PCR	
- 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	
2.2 Estudio Genómico	38

-Control de calidad
-Ancestría Global
-Faseo
-Ancestría Local
-Haplotipo común
-Origen ancestral del haplotipo
-Contenido génico de la región haplotípica

RESULTADOS 42

-Ancestría Global
-Ancestría Local
-Origen ancestral del haplotipo
a) Clasificación continental
b) Clasificación intracontinental
-Haplotipo común
-Contenido génico del haplotipo

DISCUSIÓN 57

CONCLUSIONES 60

CONSIDERACIONES ÉTICAS 61

ANEXOS 62
(Carta de consentimiento informado)

REFERENCIAS 63

RESUMEN

Antecedentes: La mutación por expansión de trinucleótidos CAG/CTG en el gen *JPH3*, que codifica para una proteína conocida como junctophilin-3, produce un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante similar al de la enfermedad de Huntington (EH), denominado Huntington disease-like 2 o fenotipo 2 similar a la enfermedad de Huntington (HDL2). El cuadro clínico se caracteriza por la presencia de un trastorno del movimiento, alteraciones neuropsiquiátricas y deterioro cognitivo. Desde su reconocimiento, se ha asociado como un trastorno exclusivo de población africana y afrodescendientes.

Objetivo: Determinar el origen ancestral de los individuos mexicanos con HDL2 a través de datos genómicos obtenidos por microarreglos.

Material y Métodos. Se estudiaron 12 individuos con mutación en *JPH3* (9 afectados y 3 portadores asintomáticos) y 4 individuos sanos, pertenecientes a 5 familias. Se obtuvo información de los registros médicos y se realizó genotipificación a través de un microarreglo de genoma completo. Se analizó un total de 419,099 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Se estimó la ancestría global y local utilizando datos de poblaciones europeas y africanas provenientes del proyecto de 1000 genomas (1KGP) y poblaciones indígena mexicana como referencia. Se utilizaron datos de poblaciones de referencia indígena, europea y africana, las dos últimas provenientes del proyecto de 1000 genomas. Se utilizaron los datos faseados para delimitar un segmento y haplotipo común alrededor de la mutación. El análisis se realizó con los programas PLINK, ADMIXTURE, Beagle y RFMIX. Se utilizaron algoritmos de aprendizaje de maquina (machine learning) implementados para Python.

Resultados. Las principales manifestaciones clínicas en los individuos con HDL2 fueron corea, disartria, irritabilidad, alteraciones del juicio, demencia y depresión. El 81% de los casos familiares son originarios de la región de la Costa Chica (estados de Guerrero y Oaxaca). En los 16 individuos estudiados, se estimó una proporción promedio del 56.39%, 27.33% y 16.26% de componente indígena, europeo y africano, respectivamente. A través de la ancestría local fue posible identificar un

segmento mínimo compartido de ancestría africana en todos los individuos con mutación, de una longitud aproximada de 1.1Mb. Se identificó un haplotipo común entre todos los individuos con mutación, con una longitud aproximada de 746 Kb. Mediante algoritmos de aprendizaje de maquina, se logro clasificar a los individuos con presencia del haplotipo hacia poblaciones de Africa centro-occidental (Yoruba).

Discusión y Conclusiones. La mayor proporción de los individuos con mutación en *JPH3* tienen orígenes de la región de la Costa Chica, una franja de asentamiento de esclavos africanos durante el periodo del Virreinato. Encontramos una mayor proporción de ancestría global africana en los sujetos con HDL2, en comparación con la estimada para la población general. Se identificó un haplotipo común de 746 Kb en todos los individuos con mutación en *JPH3* y los algoritmos de aprendizaje de maquina clasifican el haplotipo a la población Yoruba.

Palabras clave: Huntington's disease-like 2, Neurodegeneración, Gen *JPH3*, Trastorno neurodegenerativo, Fenocopia de Enfermedad de Huntington, Ancestría.

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA INVESTIGACIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

SALUD



OFICIO N° CEI/110/18
ASUNTO: PROTOCOLO N° 22/18.

Comité de Ética en Investigación

Ciudad de México, 12 de julio del 2018.

Dr. Nicasio Arriada Mendicoa
Presidente

Dra. Helgi Jung Cook
Vicepresidente

M.en C. Adriana Ochoa
Secretaría

Vocales:

Titular
Dra. Marie-Catherine Boll W
Suplente
Dra. Iris Martínez Juárez

Titular
Dr. Daniel San Juan Orta
Suplente
M. en C. Iván Pérez Neri

Titular
Dra. Mariana Espinola Nadurille
Suplente
Dr. Luis Manuel Pesci Eguía

Titular
Dra. Zoila Trujillo de los Santos
Suplente
M.E. Guadalupe Nava Galán

Titular
Dra. Alejandra Sánchez Guzmán
Suplente
Mtra. Claudia García Pastrana

Titular
Dra. Yaneth Rodríguez Agudelo
Suplente
M. en C. Mineya Chávez Oliveros

Titular
Suplente
Dr. Daniel Crail Melendez

Representante de Servicios de Salud:



DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ
INVESTIGADORA PRINCIPAL
PRESENTE

Estimada Dra. Yescas Gómez:

Con fecha 5 de julio 2018, recibimos su oficio S/N, fechado el mismo, en el que nos hace llegar la **Carta de Consentimiento Informado** con los cambios solicitados por el Comité al Protocolo de Investigación No. 22/18 intitulado: **"DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ANCESTRÍA GENÉTICA DE PACIENTES MEXICANOS CON FENOTIPO 2 SIMILAR A LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON"**, en virtud de que fue aprobado por el Comité de Investigación.

La opinión de nuestros evaluadores concuerda con que el proyecto, -desde la perspectiva Bioética- tiene valor social, científico y los métodos son adecuados para llevarlo a cabo.

La capacidad del equipo de investigación, así como los medios disponibles son idóneos y la selección de los sujetos participantes es justa y equitativa, responde a las interrogantes científicas incluidas en la investigación, intenta reducir al mínimo los riesgos y maximizar los beneficios sociales y científicos de los resultados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado es el adecuado, así como los mecanismos previstos para la protección de los datos.

En consecuencia, este Comité **APRUEBA** que el proyecto se ejecute en los términos mencionados. Se recuerda al investigador que al llevar a cabo este proyecto contrae una serie de compromisos con respecto al Comité (Anexos).

Quedamos de usted

ATENTAMENTE

DR. NICASIO ARRIADA MENDICOA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN.

M. en C. ADRIANA OCHOA MORALES
SECRETARIA

ANTECEDENTES

Los trastornos del movimiento son un grupo de condiciones clínicas con etiología 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. La corea (del griego *coros*, *danza*) se agrupa dentro de este último rubro, representa un movimiento involuntario abrupto, impredecible y arrítmico, que resulta de un flujo continuo de contracciones musculares aleatorias^[1]. 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 facial^[2], 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, la etiología de la corea es muy diversa, se puede encontrarse asociada a factores metabólicos, alteraciones estructurales cerebrales, como resultado de efectos farmacológicos y causas genéticas. Independientemente de su etiología, la base patofisiológica común es dada por la disrupción de la neurotransmisión en los núcleos de la base.

La enfermedad de Huntington

Dentro de las causas genéticas de corea, la enfermedad de Huntington (EH) representa la condición más frecuente de corea hereditaria^[3]. La EH es una condición neurodegenerativa, con modelo de herencia autosómico dominante (AD), que se caracteriza por la presencia de un trastorno hipercinético (corea hasta en 90% de los casos), alteraciones cognitivas y neuropsiquiátricas^[4].

Su etiología se debe a la expansión del trinucleótido inestable (CAG) en la región codificante del exón 1 en el gen *HTT* (huntingtin), localizado en la región

cromosómica 4p16.3^[5]. El tamaño más común de este tracto de repetidos CAG en la población general es de 17^[6], 18 para la población mexicana^[7]. 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 tracto 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)^[8].

Resulta interesante mencionar que hasta en 8% de los casos hay ausencia de datos positivos en la genealogía, lo cual sugiere que esta patología puede manifestarse como eventos *de novo* por la expansión de alelos intermedios^[9]. Este padecimiento afecta de 5 a 10 individuos por cada 100 000 habitantes en Estados Unidos y Europa. Sin embargo, en México no hay datos epidemiológicos^[10].

Como se mencionó, el cambio característico a nivel motor es dado por la instauración de movimientos coreicos, que inicialmente ocurren en la musculatura distal de dedos y ortejos, 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^[11].

La sintomatología psiquiátrica es muy común en etapas tempranas, la cual representa 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^[12], 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^[13]. El deterioro cognitivo leve 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^[14].

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 en 1996^[15] y con su modificación en 1999^[16] 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.

Los estudios de neuroimagen estructural, principalmente tomografía computada (TC) e imagen por resonancia magnética (IRM), han provisto importante evidencia de los cambios morfológicos en el encéfalo de individuos con EH. La alteración del cuerpo estriado (núcleos caudado y putamen) y la atrofia cortical son los hallazgos más frecuentes (Gráfico 1)^[17].

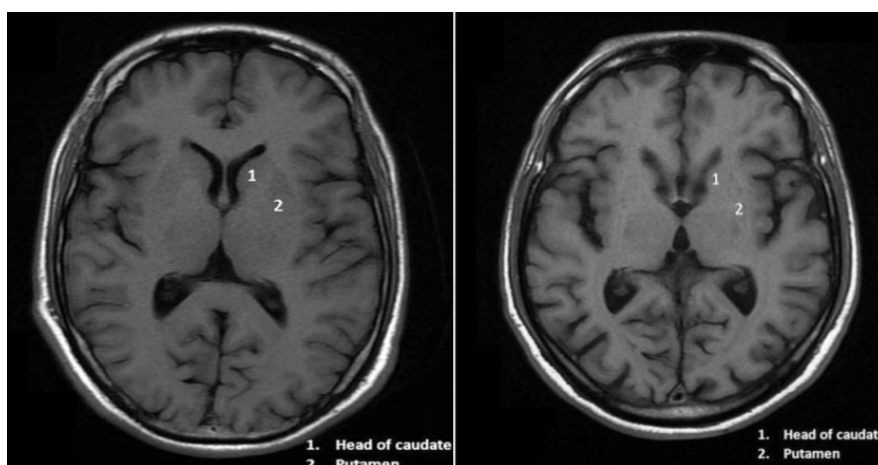


Gráfico 1. Hallazgos de IRM en EH. Comparación entre sujeto sano (izquierda) y sujeto con EH (derecha), se aprecia importante atrofia de los núcleos caudados y el putamen indicados por números 1 y 2, respectivamente.

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^[18].

Sin embargo, no todos aquellos pacientes que presentan un cuadro clínico sugestivo de EH muestran positividad para el estudio molecular de repetidos CAG, anteriormente se estimaba que de todos aquellos pacientes sometidos al estudio molecular para EH, sólo el 1% resultaba con una prueba negativa^[19 20]; empero, a través del tiempo esta noción se ha modificado ya que diversas series de casos negativos a la prueba de *HTT* a nivel global muestra una variación de este porcentaje, por ejemplo, Andrew et al.^[21] en 1994 en Vancouver, Canadá; describieron una cohorte de 1,022 individuos evaluados para el gen *HTT*, en la que 30 sujetos (2.9%) se identificaron con una prueba negativa. Sin embargo, diversas series a lo largo del tiempo han contrastado este hallazgo, llegando a mostrar rangos de negatividad hasta por encima del 40%^[22 23]. Aunque, se estima que de todos aquellos casos con resultado negativo sólo será posible encontrar una causa reconocible en el 3%, a estos trastornos relacionados se les ha denominado como *fenotipos similares a la enfermedad de Huntington* (del inglés *Huntington Disease-Like*, *HDL*) o bien, *fenocopias de la EH*^[24].

Fenotipos similares a la enfermedad de Huntington (Huntington Disease-like)

A la fecha se han caracterizado cuatro patologías bajo el termino Huntington Disease-like (HDL) o enfermedades similares a la EH, estos cuadros adoptaron la terminología HDL y una numeración en arábigos del 1-4 de acuerdo a como fueron descritos en la primera década del año 2000, de las cuales 3 tienen un origen genético identificado y comparten el mismo modelo de herencia, mientras que una mostraba un patrón de herencia autosómico recesivo (AR) y no fue posible dilucidar su causa.

- HDL1 (del inglés *Huntington Disease-Like 1*) es una entidad producida por mutaciones heterocigotas en el gen *PRNP* [25], que codifica para la proteína Prión, debido a la inserción de 192 pares de bases hacia la región 5' (región río arriba), donde se localiza 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 AD y se considera una entidad muy poco frecuente, estimándose una prevalencia de 1 en 1,000,000 individuos.
- HDL2 se debe a alteraciones en el gen *JPH3* que codifica para la proteína Juntofilina 3 [26] y produce un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante (*vease más adelante*).
- La HDL3 es una enfermedad neurodegenerativa con modelo de herencia AR, caracterizada por deterioro cognitivo, disartria, distonía, 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 un gen causal [27 28].
- HDL4 también conocida como *ataxia espinocerebelosa tipo 17* (SCA17, por sus siglas en inglés), es causada por una expansión del repetido CAG/CAA en el gen *TBP* en 6q27, que genera tractos de poliQ en la proteína de unión a la caja TATA [29]. 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, distonía, corea, alteración psiquiátrica como alteración del estado de ánimo, depresión, psicosis y demencia [30].

Otras fenocopias reconocidas de la EH

En años posteriores se identificaron otras alteraciones genéticas en diversos loci que causan una enfermedad similar a EH, estas patologías no están contempladas bajo la terminología HDL (*Huntington disease-like*), sino simplemente bajo la denominación de *fenocopias de EH*, dicho término ha sido mayormente adoptado por la comunidad médica internacional, ya que se reconoce como fenocopia al desarrollo de un cuadro clínico similar al de una enfermedad bien reconocida cuyo origen puede ser ambiental o debido a otros factores genéticos, dentro de las que encontramos:

- *Coreoacantocitosis* se trata de una forma de corea hereditaria anteriormente que se encuentra del grupo de patologías denominadas *Neuroacantocitosis*. 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^[31]. La edad de presentación frecuentemente es entre la tercera y cuarta década de la vida, las primeras manifestaciones comprenden movimientos orolinguales (con predominio de distonía), posteriormente desarrollo de tics, corea y movimientos estereotipados^[32]. Otras características incluyen cambios cognitivos y de personalidad, crisis convulsivas, disfagia, disartria, oftalmoparesia, parkinsonismo y elevación de creatina 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) ^[33].
- La *Atrofia Dentato-rubro-pálidolusiana* (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^[34]. Es un trastorno muy frecuente en Japón, aunque se han identificado familias en Europa como

Portugal e Italia^[35 36]. 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 como globo pálido, putamen o tálamo. 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^[37 38]. 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^[39]. 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)^[40], 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^[41 42].
- Alteraciones del gen *FXN* causante de la Ataxia de Friedreich, la cual es una enfermedad con modelo de herencia 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. Se ha descrito, aunque con poca frecuencia, como causa de fenocopias de la EH [43 44]. La mutación más común es la expansión anormal de un triplete repetido GAA dentro del primer intrón del gen *FXN* (9q13)[45], donde el número de repeticiones varía de 70 a 1700[46].

- *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[47]. Clínicamente se caracteriza por retraso en el desarrollo de la marcha, desarrollo de hipotonía y corea desde la infancia, además puede estar presente distonia, mioclonus y tics[48].
- 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)[49]. Dicha alteración se trata de una mutación intrónica en un gen altamente conservado, el cual muestra homología con la superfamilia de proteínas DENN[50], sugiriéndose una posible función como regulador del tráfico de membranas. Dichas mutaciones patogénicas presentan cientos a miles de estos repetidos[51].

Otros trastornos asociados a corea

Existe una amplia lista de condiciones que pueden cursar con corea, dentro de éstas las ataxias espino-cerebelosas (SCAs, por sus siglas en inglés), autosómico

dominantes 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^[52 53].

- 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 sobrepasa el umbral patológico igual o mayor de 39 repetidos en el gen *ATXN1*^[54 55].
- 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*^[56 57 58].
- Por último, la SCA3 o enfermedad de Machado-Joseph, también debida a repetidos CAG codificantes para tramos de poliQ iguales o mayores a 53 en el gen *ATXN3* puede mostrar parkinsonismo, distonía y corea^[59].

Fenotipo 2 similar a EH (HDL2)

En el año 2001, Margolis et al. ^[60] determinaron que el mecanismo molecular implicado en HDL2 era debido a la expansión del trinucleótido CAG/CTG con un número igual o mayor a 40 repetidos entre el exón 1 y 2 que contiene una región de *splicing* (corte y empalme) múltiple en el gen *JPH3*, el cual se sitúa en el locus 16q24. Cuyo producto codificante es la proteína Juntofilina 3, una proteína asociada a un complejo triproteico implicado en la regulación de la excitabilidad neuronal y en la señalización intracelular por calcio, mediante la formación de estructuras de unión membranal entre los canales de Ca⁺⁺ regulados por voltaje y la proteína rianodina encontrada en el retículo endoplasmático ^[61].

EL gen *JPH3* contiene una región polimórfica situada a 760 nucleótidos del extremo 3' (región río abajo), dentro del exón 2A, la cual contiene múltiples sitios aceptores de *splicing*. Esta expansión no forma parte del RNA mensajero (RNAm) del

transcrito principal, sino que es incluido en varios transcritos alternativos^[62]. Estos sitios diferentes de *splicing*, permiten la formación de 3 diferentes marcos de lectura, pudiendo generar que el transcrito codifique para tractos de polialanina, polileucina o formar parte del UTR 3' (región no traducible río abajo) en las isoformas del RNAm; a través de evaluación de muestras de corteza cerebral se ha confirmado la presencia de estos transcritos ^[63].

Aparentemente la mutación por expansión de CAG/CTG no tiene un efecto sobre la proteína funcional, sino que se le atribuye un efecto citotóxico por la acumulación de focos de RNA en la corteza, lo que se asemeja al mecanismo de ganancia de función de toxicidad transcripcional en la expansión de CUG en la distrofia miotónica tipo 1^[64].

De forma similar a la enfermedad de Huntington, existe una correlación inversa entre el tamaño del repetido y la edad de inicio de las manifestaciones ($R = -0.62$, $r^2 = 0.39$, $p = 0.0011$)^[65] y de manera más reciente se estima una r de Pearson de -0.76 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.585 , de acuerdo con esto, las manifestaciones pueden mostrar 2 variantes: una caracterizada por rigidez y parkinsonismo, que semeja el cuadro de presentación juvenil de la EH y puede estar asociada con repetidos de gran tamaño; la otra variante que es más frecuente, semeja la EH típica de inicio en la adultez, con presencia de corea y una progresión lenta. La muerte en estos pacientes se presenta alrededor de 10-15 años tras el inicio de los síntomas.

En la revisión sistemática por Anderson et al. ^[66] entorno a HDL2, se describe que las principales manifestaciones clínicas son la presencia de corea en 84% de los casos, alteraciones psiquiátricas en el 93%, demencia en el 78%, parkinsonismo en 38%, distonía en 37%, otras alteraciones encontradas en proporciones menores son disartria, disfagia, alteración de los movimientos oculares, mioclonus, reflejos atáxicos y acantocitos.

Este trastorno neurodegenerativo es muy frecuente entre individuos con ancestría africana, en particular, en población negra de Sudáfrica^[66]. Además, se han evaluado otras poblaciones, tanto en sujetos con sospecha de un cuadro HDL como en sujetos sanos, para la determinación del rango de repetidos CAG/CTG, los cuales pueden apreciarse en la siguiente tabla.

Autor	Año	Población	Rango de repetidos CAG/CTG en el gen <i>JPH3</i>
Holmes, et al. ⁶⁷	2001	Mixta, 273 sujetos (54 afroamericanos)	6 a 27 repetidos y una moda de 13.
Bauer, et al. ⁶⁸	2002	Caucásica, 1600 sujetos de Alemania y Austria	10 a 27 repetidos y una moda de 14.
Stevanin, et al. ⁶⁹	2002	95 sujetos sanos (44 franceses y 51 del norte de África).	9 a 18 repetidos en los franceses. 8 a 28 repetidos en sujetos del norte de África.
Keckarevic, et al. ⁷⁰	2005	198 sujetos sanos del norte de África (Serbia y Montenegro).	11 a 18 repetidos y una moda de 14.

A la fecha sólo se ha identificado a un paciente con aparente ascendencia europea y un cuadro similar a EH, originario de Brasil, que mostró una expansión de 47 CTG/CAG en el locus de HDL2. Para esclarecer el posible origen de dicha mutación y estimar la ancestría del paciente, se realizó evaluación con algunos SNPs y se determinó con ancestría europea, sin embargo, los marcadores que contenía el alelo expandido mostraban ser de origen africano ^[71].

Fenocopias de EH en México

En el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, en la tesis de maestría del autor de este escrito, se evaluó la frecuencia de mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3* y *FXN*. En esta se identificó que

de un un total de 1574 individuos evaluados con la prueba molecular de EH, 170 (10.8%) mostraron una prueba negativa, de estos sólo fue posible evaluar el material genético de 149 individuos. Se identificó un defecto molecular en el 2% de los casos, todos éstos correspondieron a una mutación en el gen *ATXN2* y no se identificaron mutaciones en los genes *ATXN1*, *ATXN3* y *FXN*[⁷²].

Además, se continuó con la evaluación de otros genes como *ATN1*, *PRNP*, *TBP* y *JPH3*, identificando casos sólo de este último, lo que planteo las bases de esta investigación.

Estudios de ancestría

Los estimados de diversidad genética han sido utilizados para tratar de esclarecer el origen de nuestra especie y para encontrar las diferencias presentes entre individuos de distintas poblaciones. El conocimiento de nuestro genoma en el futuro ha permitido esclarecer y definir diferencias existentes entre los grupos de poblaciones en seres humanos; esto se ha logrado a través de diversos esfuerzos internacionales como el proyecto de secuenciación del genoma humano, el HapMap⁷³, el Proyecto de 1000 genomas (1KGP) [⁷⁴], entre otros, que han contribuido con información de poblaciones de referencia y que han permitido la generación de grandes bases de datos para el estudio de marcadores de DNA como son los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphism*), marcadores microsatélites, elementos Alu y secuencias de DNA mitocondrial, que definen la variación genética existente entre los distintos grupos poblacionales[⁷⁵].

El análisis de las estructura poblacional basada en estudios de ancestría genética es un amplio campo de estudio donde se abordan diversas problemáticas de las poblaciones, dentro de las que se pueden incluir: 1) detección de la estructura poblacional, 2) definición de subpoblaciones en una muestra, 3) asignación de individuos a subpoblaciones, 4) definición de poblaciones ancestrales en

poblaciones mestizas, 5) asignar las proporciones de poblaciones ancestrales en individuos mestizos y 6) identificación de ancestría genética de distintas regiones cromosómicas dentro de un individuo. Sin embargo, no existe un único método o software que resuelva todos estos problemas^[76].

El uso de la genotipificación mediante plataformas de SNPs ha permitido la colección de marcadores para la valoración de la ancestría genética en las diversas poblaciones. Diversos paneles de SNPs denominados como marcadores informativos de ancestría (AIMs, del inglés *ancestry informative markers*) pueden ser utilizados para la estimación de la ancestría genética. Los AIMs son marcadores cuya frecuencia son significativamente diferentes entre 2 o más poblaciones. Los paneles disponibles de AIMs pueden variar en tamaño, paneles de tamaño pequeño que contienen docenas a cientos de SNPs que pueden ser utilizados cuando el propósito es determinar la ancestría continental, mientras que el uso de cientos a miles de SNPs son requeridos para la estimación más refinada subcontinental o para el mapeo de mestizaje por equilibrio de ligamiento (MALD, del inglés *mapping by admixture linkage disequilibrium*). Además, subconjuntos de AIMs pueden ser seleccionados de estudios de GWAS, utilizando abordajes tradicionales de SNPs o de manera más reciente con el análisis de componentes principales (PCA, del inglés *principal component analysis*). En genética médica el uso más común de la estimación de la ancestría se basa en la comparación de un grupo control contra una población específica de estudio. Los software que existen para la estimación de la ancestría pueden ser divididos en aquellos que confían en métodos de estadística multivariada, como el PCA y el análisis de agrupados, y aquellos que hacen uso de modelos genéticos, si bien esta distinción no implica que no existan similitudes entre los métodos algorítmicos y los basados en modelaje^[77].

La ancestría global es la fracción de ancestría genómica de un individuo con mestizaje que se puede atribuir a cada una de las poblaciones ancestrales que contribuyen a la población de reciente formación (mezclada). La estimación de ancestría se puede obtener utilizando diferentes enfoques. Algunos de los métodos

más populares se basan en modelos probabilísticos que utilizan datos de genotipos, asumiendo que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg y considerando un equilibrio de ligamiento completo para todos los loci considerados para la estimación, como STRUCTURE y ADMIXTURE. Los enfoques alternativos que permiten la estimación de las proporciones de ascendencia se basan en descomposiciones de componentes principales, como PCA, y en el estudio de curvas de decaimiento del desequilibrio de ligamiento, como ALDER^[78].

Ancestría local es un término comúnmente utilizado para referirse a la ancestría en cada uno de los bloques cromosómicos, también conocidos como pistas ancestrales, en individuos de poblaciones de reciente mestizaje. Para ello, se requiere inferir el número de copias derivadas de cada población ancestral, en cada posición genómica, por individuo (de cero a dos copias)^[79].

La tecnología de microarreglos

La tecnología de microarreglos tiene la ventaja de evaluar miles de variantes a través de una sola muestra. El genoma humano tiene más de 10 millones de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, en inglés) compartidos. Solo una pequeña proporción funciona como polimorfismos de etiquetado, tales marcadores actúan con una variación de patrones y pueden ser utilizados para mapear mucha de la variación genética entre individuos. De manera preliminar se estimaba que se requerían entre 200,000-300,000 SNPs de etiquetado para mapear la mayoría de la variación del genoma, dependiendo de la población estudiada. Sin embargo, algunas regiones del genoma podrían no ser sensibles a través de este abordaje y requerirían una mayor densidad de SNPs^[80].

Un microarreglo (o chip), se refiere a una placa de silicio que contiene impresas miles de secuencias nucleotídicas que se encuentran en perfectamente ordenadas y forman diversas retículas. El funcionamiento de los microarreglos está fundamentado en la hibridación de ácidos nucleicos, o unión de secuencias de DNA

de las muestras en estudio (problema) y las muestras control que se encuentran marcadas con fluorescencia. Para que posteriormente estos fragmentos de DNA no complementario sean lavados y eliminados. Por último, las secuencias que han hibridado a lo largo de todas las resticulas del chip son sujetas a un escaneo mediante un LASER confocal. La intensidad de señal es captada e interpretada como la presencia de una variante en una posición específica, este proceso es llevado a cabo simultaneamente con la detección de miles a millones de señales a través del genoma. El flujo de trabajo de un microarreglo de SNPs se muestra en el Gráfico 2.

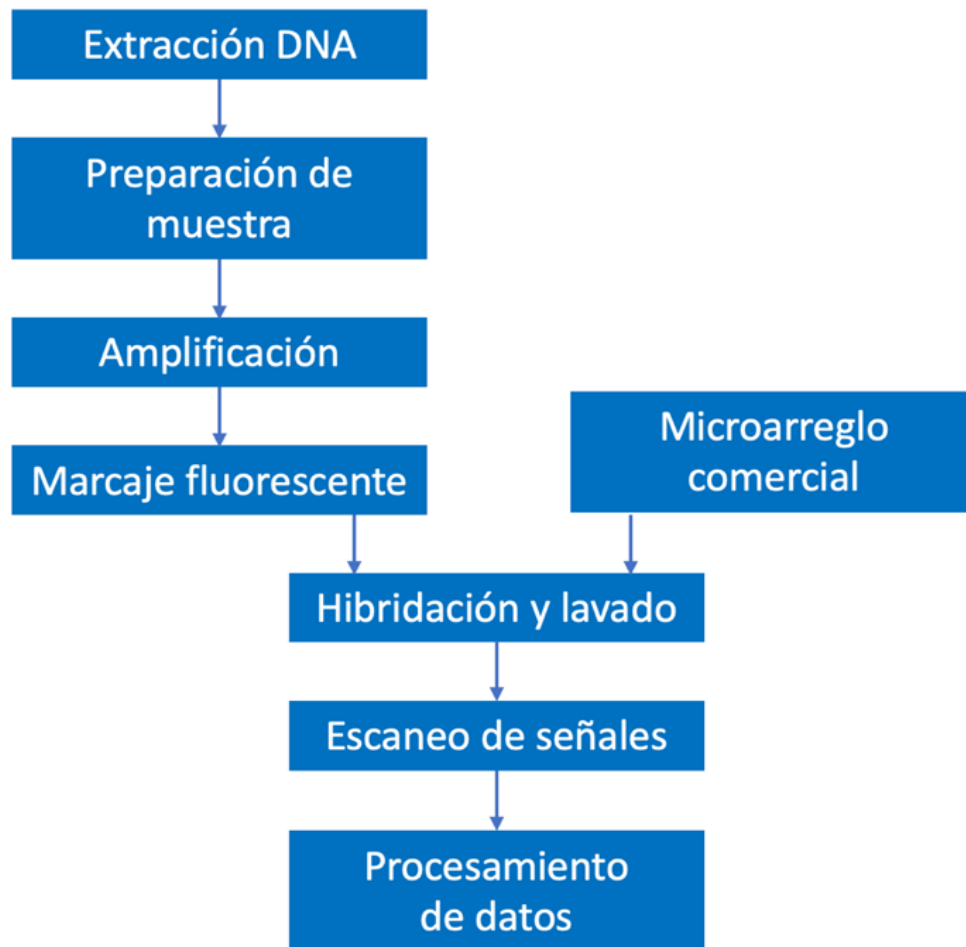


Gráfico 2. Procesamiento de un microarreglo de SNPs. El flujo de trabajo de un microarreglo de SNPs incluye una serie de pasos: de manera inicial, el DNA genómico en estudio (o problema) debe ser extraído, luego deberá ser amplificado por PCR y marcado con tinciones fluorescentes. Una vez que el DNA cuenta con el marcado fluorescente es puesto a hibridizar con las sondas del microarreglo de acuerdo con las especificaciones del fabricante de chips. Posteriormente el microarreglo recibe lavados con soluciones que permiten eliminar secuencias no complementarias y el exceso de las tinciones. Posteriormente se utiliza un escáner LASER para la detección de la fluorescencia. Por último, un proceso de computo analiza las señales emitidas y genera un conjunto de datos específico de la muestra problema evaluada, que requerirá un posterior procesamiento bioinformático según sea el objetivo de la evaluación.

Estudios de ancestría en México

El entendimiento de los patrones de estructura poblacional en poblaciones latinoamericanas plantea diversos y serios desafíos para los estudios genéticos, además de representar un poderoso recurso para el análisis de las bases genéticas de las enfermedades. En específico las poblaciones americanas nativas cuando son tomadas en conjunto muestran una diversidad baja en comparativa a cualquier otro grupo continental, pero entre subpoblaciones muestran una alta divergencia y como resultado, hoy en día las poblaciones indígenas americanas pueden portar alelos únicos o infrecuentes en otras poblaciones, los cuales incluyen variantes funcionales y biológicamente relevantes. México es considerado como un punto importante para llevar a cabo tales análisis debido a que representa una de las más grandes fuentes de diversidad precolombina.

La población mestizo-mexicana actual se considera que surge en el año 1521 con la llegada de los conquistadores españoles, originó al inicio, una mezcla de poblaciones que geográficamente estuvieron separadas por un gran periodo. En términos antropológicos, los mestizos mexicanos representan una mezcla

poblacional de reciente formación conformada principalmente por orígenes ancestrales amerindio y europeo, y en menor proporción africano^[81].

De acuerdo al estudio de Moreno-Estrada, et al. del 2014^[82] donde se determinaron los principales componentes poblacionales de 1000 individuos que incluyeron el estudio de 20 grupos indígenas y 11 poblaciones mestizas, se pudo corroborar un componente europeo de variable proporción dependiendo la región geográfica, siendo de mayor proporción en los estados del norte del país y menor en el sur, el componente indígena muestra un comportamiento inverso, mostrando menor proporción en estados del norte y con mayor proporción en estados del sur, en cuanto a la proporción de componente africano se estima que este es menor del 5% en casi todos los grupos evaluados. Este comportamiento es idéntico tanto en poblaciones de grupos indígenas como en el de grupos cosmopolitas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las fenocopias de la EH representan un reto diagnóstico en la mayor parte de los casos debido a que son un grupo de patologías con una etiología muy heterogénea, de curso crónico que confina incapacidad y pérdida de la calidad de vida, ya que la mayor parte de estos individuos se encuentran en edades productivas de la vida.

El haber podido diagnosticar a pacientes con mutaciones en *JPH3*, puso de manifiesto la necesidad de corroborar el posible origen africano previamente descrito en otros estudios, ya que en nuestro país al tener una de las poblaciones con gran diversidad de mestizaje no fue posible conjeturar el origen africano solo mediante rasgos antropofísicos, por lo que también consideramos que la evaluación mediante marcadores de ancestría nos podría brindar información sobre el componente poblacional de estos individuos, lo cual nos hizo preguntarnos:

¿Cuál es el componente ancestral de los pacientes mexicanos con fenotipo 2 similar a EH (HDL2) y si existe un haplotipo común en los individuos con mutación en *JPH3*?

HIPÓTESIS

H₀ Los pacientes mexicanos con fenotipo 2 similar a EH no mostrarán mayor componente ancestral de origen africano en su análisis genómico, asimismo no existirá un haplotipo común en los individuos con mutación en gen *JPH3*.

H₁ Los pacientes mexicanos con fenotipo 2 similar a EH mostrarán un mayor componente ancestral de origen africano en su análisis genómico, asimismo existirá un haplotipo común en los individuos con mutación en gen *JPH3*.

OBJETIVOS

-OBJETIVO GENERAL

-Determinar el componente ancestral de pacientes mexicanos con fenotipo 2 similar a EH y determinar si existe un haplotipo común en los individuos con mutación en gen *JPH3*.

-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Estimar la proporción global y por cromosoma de componente indígena, europeo y africano de estos pacientes.

-Determinar si existe un haplotipo de riesgo en los individuos con mutación en gen *JPH3*.

-Imputar un posible origen ancestral si existe un haplotipo común en los individuos con mutación en gen *JPH3*.

-Describir las principales manifestaciones clínicas de los pacientes con HDL2.

JUSTIFICACIÓN

Una dificultad presente en nuestra población, a diferencia de las series de casos de HDL2 descritas en Sudafrica, Estados Unidos y Brasil es que nuestra población se encuentra conformada por un amplio mestizaje, lo que ha diluido muchas de las características fenotípicas sobresalientes de las poblaciones ancestrales que la componen, por lo que se vuelve sumamente difícil identificar los posibles orígenes solo por rasgos antropofísicos, en la literatura existe la descripción de un individuo con ancestría y rasgos caucásicos, con un cuadro clínico similar a EH y mutación corroborada en *JPH3*, frente a tal hallazgo se manifestó la necesidad de evaluación de marcadores genéticos de ancestría, los cuales demostraron ser representativos de población africana. Éste estudio y el de otras series han evaluado a los individuos afectados mediante pocos marcadores SNPs y/o microsatélites, por lo que solo se han evaluado algunos marcadores de ancestría. Por lo expuesto, consideramos que es necesario dilucidar si existe un haplotipo común para el HDL2 en el caso de los pacientes mexicanos.

En un estudio preliminar por el equipo de trabajo (datos en proceso de publicación) esta enfermedad representó ser una causa frecuente de fenocopias de EH en la población mexicana. Saber el origen y la disposición geográfica de las familias con HDL2, permitirá proponer la realización de una prueba molecular específica desde un inicio cuando se capten individuos con cuadro similar a EH y que provengan de regiones específicas del país, lo que disminuirá costos y el tiempo de incertidumbre para los pacientes. Asimismo, es necesario encontrar marcadores clínicos que ayuden a diferenciar este trastorno de la EH.

METODOLOGÍA

a) **Diseño:**

Por análisis: comparativo analítico.

Por recolección de los datos: ambilectivo.

Por intervención: observacional.

Por diseño: transversal.

b) **Población y muestra**

Se incluyeron todos aquellos casos de pacientes diagnosticados como HDL2, de quienes se contaba con adecuada calidad y cantidad de DNA para el análisis genómico.

c) **Criterios de selección del estudio**

Criterios de inclusión:

Se seleccionaron muestras de sujetos de cualquier edad, de cualquier género, que cursaron con cuadro sugestivo de EH y que obtuvieron una prueba negativa para la expansión de repetidos CAG del gen *HTT*. Dichas muestras fueron evaluadas para la expansión de repetidos CAG/CTG del gen *JPH3*, aquellas muestras de sujetos donde se identificó una mutación por expansión fueron considerados para la inclusión en el estudio. Además, se seleccionaron todos aquellos nuevos casos de HDL2 detectados durante el primer año de iniciado el proyecto. De manera final, las muestras de los casos detectados se utilizaron para la evaluación genómica; y para el estudio, solo se incluyeron aquellas donde se logró adecuada genotipificación.

Además se incluyeron a sujetos sanos pertenecientes a las genealogías de los sujetos con HDL2 para evaluación molecular de *JPH3* y análisis genómico.

Criterios de exclusión:

Se excluyeron aquellas muestras de DNA de individuos con diagnóstico de HDL2 que no contaban con la calidad suficiente para el análisis genómico, o bien muestras de DNA de sujetos donde no se lograron evaluar por completo las pruebas moleculares propuestas. Así también, aquellos pacientes que desearon no continuar en el proyecto.

d) Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo con frecuencias y porcentajes para variables cualitativas.

Para la estimación de la ancestría global y local se realizaron diversos análisis bioinformáticos, los cuales se describirán en cada uno de los apartados de la sección **Estudio Genómico**.

e) Variables

Variable	Definición Operacional	Escala de Medición	Tipo de Variable
Demográficas			
Edad	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta el momento de la captura de 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 manifestaciones clínicas.	Años	Cuantitativa discreta
Tiempo de evolución	Tiempo transcurrido en años desde el inicio de manifestaciones clínicas hasta el momento de la captura de los datos.	Años	Cuantitativa discreta

Edad de muerte	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta la muerte.	Años	Cuantitativa discreta
Clínicas			
Corea	Movimiento involuntario abrupto, impredecible y arrítmico.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Disartria	Dificultad para articular sonidos y palabras causada por una parálisis o una ataxia de los centros nerviosos que rigen los órganos fonatorios.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Demencia	Síndrome que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Irritabilidad	Estado emocional en el que una persona tiene un temperamento explosivo y se molesta o enoja fácilmente.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Agresividad	Estado emocional que consiste en sentimientos de odio y deseos de dañar a otra persona.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Ideación suicida	Tendencia a pensar de manera repetida en la posibilidad de terminar con la propia vida.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Hipersexualidad	Preocupación excesiva por fantasías, impulsos o conductas sexuales que es difícil de controlar, provoca angustia o afecta, de manera negativa, la salud, el trabajo, las relaciones u otros aspectos de la vida.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Insomnio	Trastorno del sueño frecuente que puede causar dificultad para conciliar el sueño (quedarse dormido) o mantenerlo.	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica
Ataxia	Trastorno motor que se caracteriza por una falta de coordinación en la realización de movimientos voluntarios que altera su velocidad y precisión. Esta falta de coordinación afecta a la marcha, las extremidades, los	1. Presencia 2. Ausencia	Cualitativa dicotómica

	movimientos oculares y el habla.		
Distonía	Contracciones musculares involuntarias, sostenidas o intermitentes, que causan movimientos de torsión repetidos y/o posturas anómalas que se producen por la contracción muscular simultánea de músculos agonistas y antagonistas.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presencia 2. Ausencia 	Cualitativa dicotómica
Independientes			
Mutación en el gen <i>JPH3</i>	Cambio en la secuencia de la región polimórfica de CAG/CTG cuando existen más de 40 repeticiones.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presencia 2. Ausencia 	Cualitativa dicotómica
Dependientes			
Análisis de ancestría global	Proporción de ancestría genómica de un individuo con mestizaje que se puede atribuir a cada una de las poblaciones ancestrales.	Proporción	Cuantitativa continua
Análisis de ancestría local	Proporción de ancestría por bloque por bloques cromosómicos, mediante la inferencia del número de copias derivadas de cada población ancestral.	Proporción	Cuantitativa continua

PROCEDIMIENTOS

Se seleccionaron muestras de casos de pacientes mexicanos que contaban con una prueba negativa para la expansión para repetidos CAG en el gen *HTT* y se tenía sospecha de fenotipo similar a EH, que habían sido remitidos al Departamento de Genética del INNNMVS en la Ciudad de México, entre 1994 y diciembre 2019. Tras la evaluación molecular e identificación de una mutación dinámica en el gen *JPH3*, los casos positivos fueron contactados para la entrega de resultado, así como todos aquellos casos que se detectaron durante el desarrollo del proyecto. El estudiante de doctorado contactó vía telefónica con los pacientes (casos previos y nuevos), se les explicó sobre objetivos del protocolo de investigación y se les hizo una cordial invitación para participar en el proyecto.

1. Evaluación clínica

A todos los individuos vivos con cuadro clínico de HDL2, así como individuos sanos (portadores y no portadores de mutación) se realizó evaluación clínica por el autor de este escrito (médico especialista en genética médica y formación de alta especialidad en neurogenética) y por el Dr. Leo Bayliss Amaya (médico especialista en neurología y formación de alta especialidad en trastornos neurocognitivos). En los casos de individuos finados por complicaciones del cuadro de HDL2, la información se extrajo de sus registros médicos.

2. Evaluación molecular

Se trabajó con el DNA de los pacientes previamente analizados para repetidos CAG en el gen *HTT* por sospecha de EH, se realizó evaluación molecular en el gen *JPH3*. En sujetos vivos, cuya muestra de DNA se apreciaba con cantidad o calidad inadecuada para llevar a cabo las evaluaciones moleculares, se les solicitó nueva

toma de sangre periférica (previa firma de documento de consentimiento informado y siguiendo los lineamientos del comité de ética local).

Muestra biológica

Se obtuvo mediante venopunción una muestra de 10mL de sangre periférica en tubos Vacutainer® con citrato de sodio y dextrosa como anticoagulantes. Previo consentimiento informado.

Extracción de DNA

El DNA genómico fue obtenido a partir de sangre periférica mediante el estuche comercial QIAquick Gel Extraction Kit®, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En el contexto de pacientes finados, con los que se contaba con muestra previa, para incrementar la calidad y pureza se realizó re-purificación con un estuche comercial Wizard® DNA Clean-Up System Promega.

Cuantificación y análisis de integridad del DNA

Se determinó la concentración y pureza del DNA obtenido mediante espectrofotometría y se determinaron las relaciones a 260 y 280 nanómetros. Se realizó el análisis de espectrofotometría en un equipo Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific®) para la cuantificación de las muestras. El equipo fue calibrado de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando un blanco de agua destilada antes de llevar a cabo las mediciones. Para una medición se depositó 1 µL 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. Se realizaron alícuotas de cada una de las muestras a una concentración final de 100ng/μL. La integridad del DNA fue analizada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1%/TBE0.5X teñidos con bromuro de etidio. La migración se realizó a 100 volts durante 45 minutos.

2.1 Evaluación del gen *JPH3*

-Amplificación por PCR

La región de interés de cada gen se amplificó mediante la técnica molecular de PCR de punto final, empleando oligonucleótidos que flanquean las regiones del exon 2A del gen *JPH3*. La secuencia de los oligonucleótidos empleados fueron: Oligo Forward (5'>3') GCTCCGAAGCTTCCTTATGGCACT GGACTGAC, y Oligo Reverse (5'>3') GATGCGTCTAGAGTTCCTGTGTTG CCTGCTG. A continuación se muestran las concentraciones y los volúmenes de los reactivos necesarios para la reacción, así como las condiciones de tiempo y temperatura.

Reactivo	Concentración	Volumen
DNA	100 ng/ μl	3 μl
Primer Forward	25 ng/ μl	1 μl
Primer Reverse	25 ng/ μl	1 μl
Master Mix	10X	10 μl
H2O libre de nucleasas	-	10 μl
Volumen final	-	25 μl

Fase	Temperatura	Tiempo	32 ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 minutos	
Desnaturalización	94 °C	20 segundos	
Alineación	60 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	30 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	
Conservación	4 °C	∞	

-Resolución de productos de PCR

Los amplicones del gen *JPH3*, fueron resueltos en geles de agarosa (3 %/TBE 1X) y se corrieron en cámara de electroforesis horizontal a 120 V/ 90 minutos, el tamaño del producto esperado para el alelo silvestre es de cerca de 100pb, mientras que los alelos con expansión muestran productos de más de 200pb. Para corroborar el tamaño de los productos se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler® 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific®.

-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.

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 µL.
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 µL 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 centrifugo 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.

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

2.2 Estudio genómico

Se utilizaron las muestras de ADN de 16 individuos, 12 con mutación en el gen de *JPH3* (9 afectados y 3 portadores no afectados) y 4 individuos sin mutación. Todas las muestras seleccionadas cumplieron con los criterios de cantidad e integridad requeridas para el estudio genómico. Se utilizó el microarreglo comercial Multi-Ethnic Genotyping Array (MEGA)® de Illumina. El microarreglo MEGA contiene 1.3 millones de SNPs^[83] identificados en poblaciones étnicamente diversas y es procesado con la plataforma iScan™ System de Illumina^[84]. El microarreglo fue diseñado con la participación de diferentes consorcios internacionales con la finalidad de mejorar el mapeo fino y la identificación de variantes funcionales para rasgos metabólicos, cardiovasculares, renales, inflamatorios, antropométricos, entre otros rasgos^[85].

-Control de calidad

Se aplicaron controles de calidad (QC) con el software PLINK^[86]. Se removieron SNPs con base en una tasa de genotipos faltantes < 0.10 (call rate), la frecuencia del alelo menor (MAF por sus siglas en inglés) < 0.05 . Se estimó la proporción de identidad por descendencia entre los individuos para validar las relaciones de parentesco. Tras los controles de calidad, permanecieron 550,085 SNPs autosómicos.

Se utilizaron datos del Proyecto de 1000 genomas (1KGP) como poblaciones de referencia: cinco poblaciones africanas (AFR) (99 individuos Esan de Nigeria <ESN>, 113 de la División Occidental, Gambia <GWD>, 99 Luhya de Webuye, Kenia <LWK>, 85 Mende de Sierra Leona <MSL> y 108 Yorubas en Ibadan, Nigeria <YRI>) y cinco poblaciones europeas (EUR) (99 individuos del noroeste de Europa-Utah, EUA <CEU>, 99 individuos de Finlandia <FIN>, 91 de Inglaterra y Escocia <GBR>, 107 de la península Ibérica, España <IBS> y 107 de la región Toscana, Italia <TSI>). Adicionalmente, se utilizaron datos genómicos de 30 individuos no-relacionados de población indígena del centro de México (NAT)^[87]. El conjunto de SNPs comunes consistió de un total de 419,099 SNPs autosómicos.

-Ancestría global

La ancestría global es la proporción de diferentes componentes ancestrales en el genoma de un individuo, la cual fue determinada utilizando el software ADMIXTURE^[88], asumiendo $K=3$. Dicho programa se enfoca en una estimación de máxima verosimilitud (MLE por sus siglas en inglés) y tomando como base las proporciones estimadas, se calcularon la media y desviación estándar (DE) para todo el genoma y por cromosoma. Además, se utilizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) implementado en PLINK^[86].

-Faseo

El faseo es una estimación estadística de los haplotipos tomando como base los genotipos. Se utilizaron los datos faseados de 1KGP en conjunto con datos de 30 individuos de poblaciones nativas de México (NAT) como referencia. Estos últimos corresponden a los individuos no-relacionados de 15 tríos pertenecientes a grupos étnicos del centro-sur de México, los cuales fueron genotipificados con los microarreglos OmniExpress y MEGA, faseados y fusionados con los datos de 1KGP con la finalidad de complementar la variabilidad de haplotipos de referencia. El faseo se realizó con el programa Beagle 5.0 con 5 iteraciones y ventanas de 40 cM^[89] utilizando los datos NAT-1KGP como referencia.

-Ancestría local

La ancestría local es, dada una población de referencia, la ancestría segmento por segmento a lo largo de todo el genoma. La ancestría local se estimó utilizando RFMix 1.5 con 5 iteraciones^[90]. Como población de referencia se utilizaron los datos de CEU y YRI de 1KGP y los datos de los NAT descritos previamente.

-Haplotipo común

Se utilizaron los datos faseados para identificar y delimitar un haplotipo común en los individuos. Además, se realizó un análisis implementado en R, para comparar el haplotipo común con haplotipos observados en las poblaciones de referencia AFR (ESN, GWD, LWK, MSL y YRI) y EUR (CEU, FIN, GBR, IBS y TSI) del 1KGP, y de NAT.

-Origen ancestral del haplotipo

Utilizando las poblaciones de referencia AFR y EUR del 1KGP, y NAT se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y un análisis discriminante cuadrático (QDA, por sus siglas en inglés) para determinar el origen ancestral del haplotipo común. Dado que las poblaciones de referencia no están balanceadas se utilizó un algoritmo como SMOTE-Tomek⁹¹ implementado en Python. El algoritmo SMOTE-Tomek genera muestras sintéticas para balancear los grupos y elimina muestras de los grupos mayoritarios y minoritarios que estén muy próximas entre sí.

-Contenido génico de la región haplotípica

Se utilizó la base de datos Ensembl^[92] para explorar otros genes, además de *JPH3*, contenidos dentro del haplotipo común identificado y se utilizaron los programas de modelaje *in silico* HuRI, STRING^[93 94] para la posible interacción protéica.

RESULTADOS

De 1994 a 2019, 1893 muestras sujetos fueron evaluadas para la prueba de expansión CAG en el gen *HTT* en el Departamento de Genética INNNMVS. Estos correspondieron a 997 casos índice (familias), 781 fueron casos familiares de EH (1624 individuos) y 216 casos índice negativos para *HTT* (269 individuos). De los 216 casos índice negativos para EH, 19 correspondieron a alelos intermedios del gen *HTT* y se eliminaron 50 muestras de sujetos por no contar con adecuada calidad o cantidad de material genético para llevar a cabo las evaluaciones moleculares propuestas. Se realizó evaluación molecular del gen *JPH3* en 147 muestras identificando mutación en 8 casos índice correspondientes a una frecuencia del 5%. La estrategia para la selección de la muestra se aprecia en la figura 1.

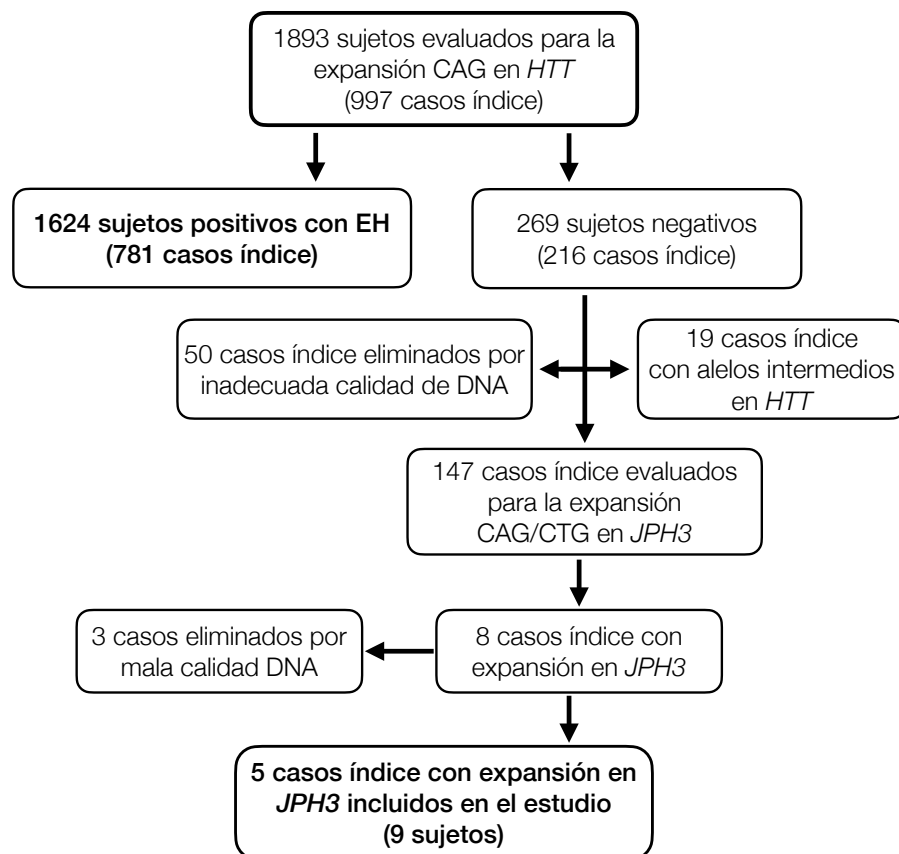


Figura 1. Algoritmo para la identificación y selección de sujetos.

Sin embargo, por cuestión de disponibilidad de cantidad y calidad para la evaluación genómica sólo se incluyeron 5 casos índice y la extensión de evaluación en familiares permitió que se incluyeron 16 sujetos en el estudio, 12 de ellos con mutación por expansión de repetidos CAG/CTG en el gen *JPH3* (9 con cuadro de HDL2 y 3 portadores asintomáticos) y 4 fueron sujetos sanos sin mutación. El total de sujetos estudiados pertenece a 5 genealogías, 5 de los 9 individuos con HDL2 pertenecían a una sólo familia como se muestra en la Figura 2. Los 12 individuos con mutación (M) contaban con el antecedente de ser originarios, o bien, tener ancestros que provenían de los estados de Guerrero y Oaxaca, específicamente de municipios que conforman parte de la región de la Costa Chica de México, una franja territorial de la región pacífico sur del país que se extiende a través de estos 2 estados. De estos, 11 tienen origen en el estado de Guerrero (4 familias) y un caso índice con origen del estado de Oaxaca (Figura 2A). Los 4 individuos sanos sin mutación (NM) pertenecientes a una de las genealogías fueron los únicos sujetos disponibles y que aceptaron participar en el estudio (*ver* apartado de consideraciones éticas).

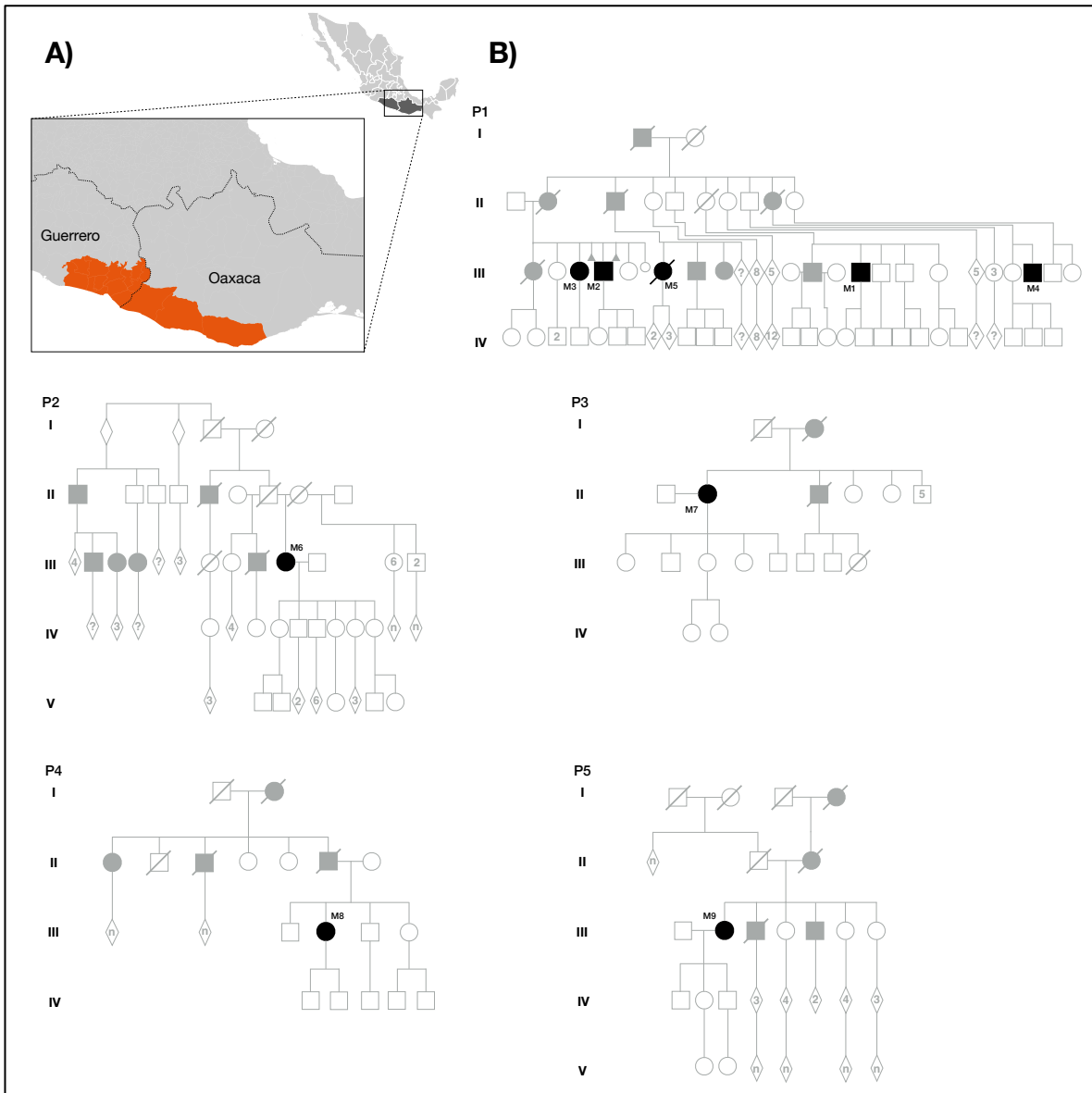


Figura 2. (A) Mapa del suroeste de México. En el recuadro pequeño se muestran los estados de Guerrero y Oaxaca (gris oscuro). El recuadro con ampliación se muestra la franja territorial que conforma la región de la Costa Chica (naranja) y la división política (línea punteada). (B) P1-P5 Genealogías de los sujetos evaluados en el estudio con mutación y cuadro clínico de HDL2, en P1 se omite la identificación de los individuos sanos y portadores asintomáticos (ver apartado de consideraciones éticas).

En la tabla 1, se presentan las principales características clínicas y demográficas identificadas en la muestra.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los individuos estudiados.

Individuo Características	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	NM1	NM2	NM3	NM4
Expansión en <i>JPH3</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X
Genealogía (#)	P ¹	P ¹	P ¹	P ¹	P ¹	P ²	P ³	P ⁴	P ⁵	P ¹	P ¹	P ¹	P ¹	P ¹	P ¹	P ¹
Ancistros de la Costa Chica	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sexo	M	M	F	M	F	F	F	F	F	F*	F*	M*	F	F	M	M
Manifestaciones de HDL2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Eda de inicio	33	31	35	37	34	45	49	36	54	-	-	-	-	-	-	-
Disartria	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Alteración del juicio	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Demencia	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Disartria	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Depresión	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Irritabilidad	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Agresividad	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ideación suicida	✓	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipersexualidad	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alteración del sueño	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Corea	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Ataxia	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-
Distonía	✓	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-

✓, manifestación presente; -, manifestación ausente; M1-12, portador de mutación; NM, no portador de mutación; *, ver apartado de consideraciones éticas.

La estimación de proporción de identidad por descendencia (IBD, del inglés *identity by descent*), validó las relaciones de parentesco entre los individuos estudiados de una misma familia, asimismo se aprecia una muy baja compartición de información genética entre los sujetos de las diferentes genealogías (Figura 3).



Figura 3. Matriz de IBDs que muestra las proporciones de información compartida entre todos los individuos estudiados. P1-M: genealogía 1, individuos con mutación (M1-M5 y M10-M12); P1-NM: genealogía 1, individuos sin mutación (NM1-NM4); P2-M: genealogía 2, individuo con mutación (M6); P3-M: genealogía 3, individuo con mutación (M7); P4-M: genealogía 4, individuo con mutación (M8); P5-M: genealogía 5, individuo con mutación (M9).

Ancestría Global

En la Figura 3A se muestra el análisis de escalamiento multidimensional (MDS, por sus siglas en inglés) utilizando poblaciones continentales AFR, EUR y NAT como referencia. El componente 1 separa a los individuos AFR del resto, mientras que, el componente 2 separa a los EUR de los individuos NAT. Asimismo, se aprecia a los 16 individuos estudiados. En la Figura 3B se muestra el MDS incorporando únicamente a las poblaciones de AFR, es decir ESN, GWD, LWK, MSL y YRI.

El análisis de ADMIXTURE para $K=3$ para los individuos con mutación, estima una proporción de ancestría NAT que con un promedio de 56.39% (DE +/- 0.0943); la proporción de ancestría EUR fue de 27.33% (DE +/- 0.0717); por su parte, la proporción de ancestría AFR oscila entre 7.2 y 43.2% con una ancestría promedio de 16.26% (DE +/- 0.099) entre todos los sujetos evaluados (Figura 4). Se evaluó la proporción de ancestría AFR por cromosoma en aquellos sujetos con mutación, sin identificarse diferencias significativas, aunque el cromosoma 16 muestra una de las medianas más elevadas (Figura 5).

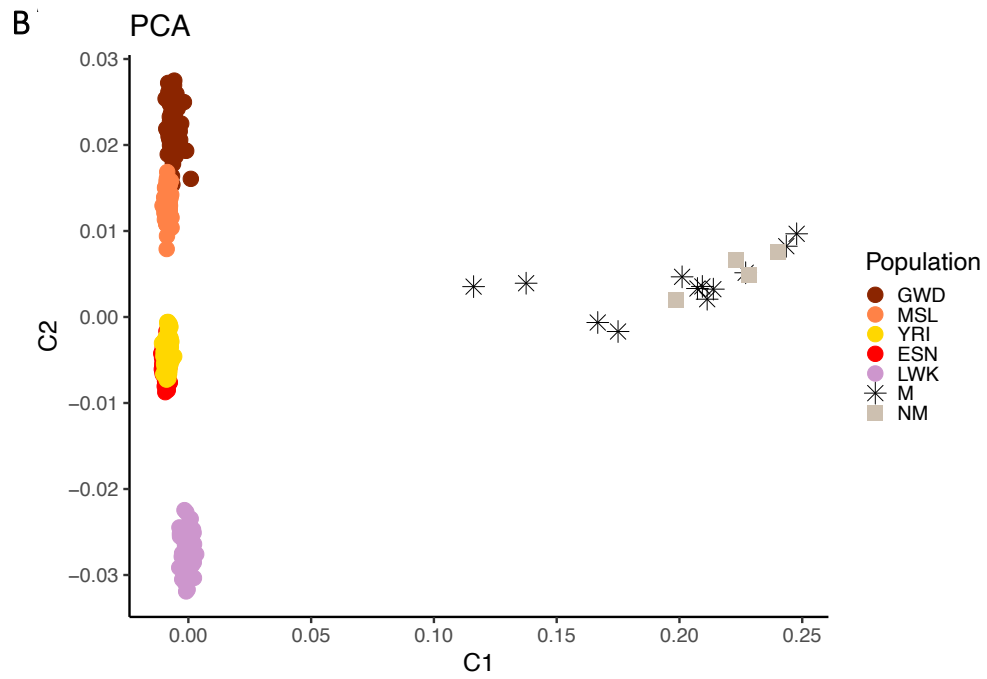
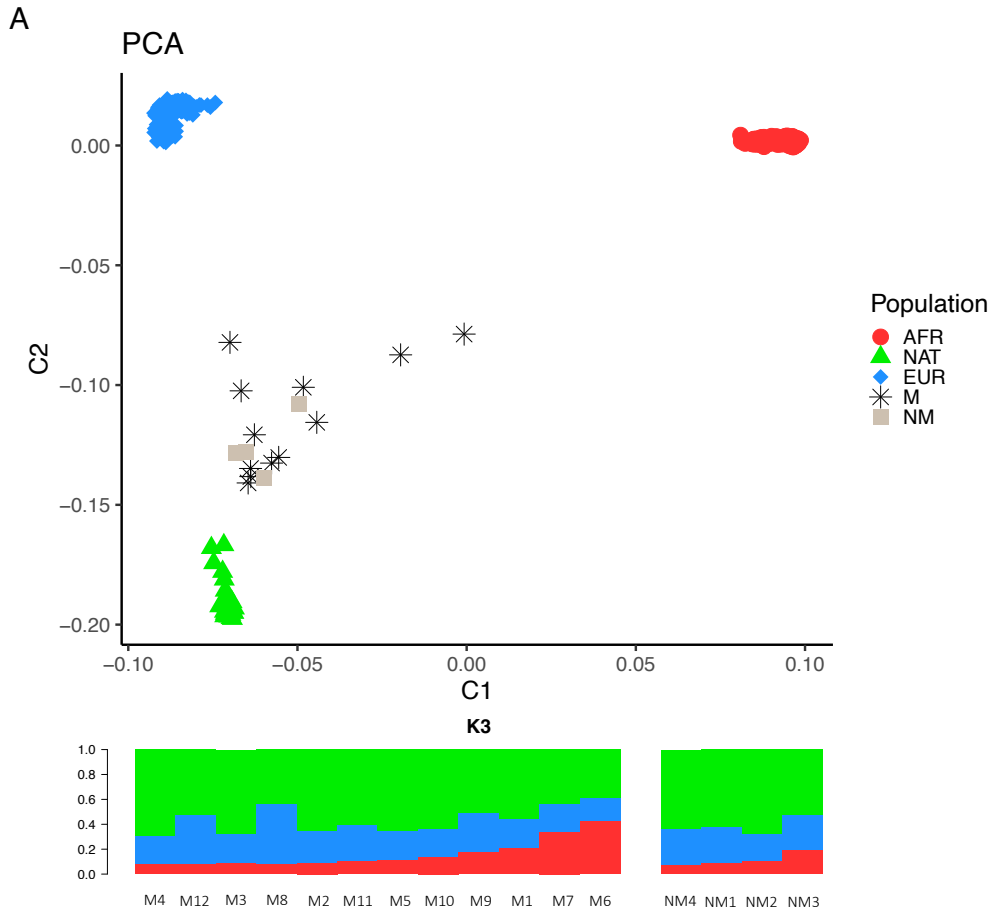


Figura 4. (A) Análisis MDS utilizando poblaciones continentales AFR, EUR y NAT como referencia. (B) Análisis MDS subpoblaciones africanas de referencia (ESN: Esan, Nigeria; GWD: División Occidental, Gambia; LWK: Webuye, Kenia; MSL: Mende, Sierra Leona; YRI: Ibadan, Nigeria). Los asteriscos negros y los cuadrados grises representan sujetos con mutación (M) y sin mutación (NM), respectivamente. Diagramas de barras con $K=3$ que muestran las proporciones de ancestría NAT, EUR y AFR de los individuos de la muestra.

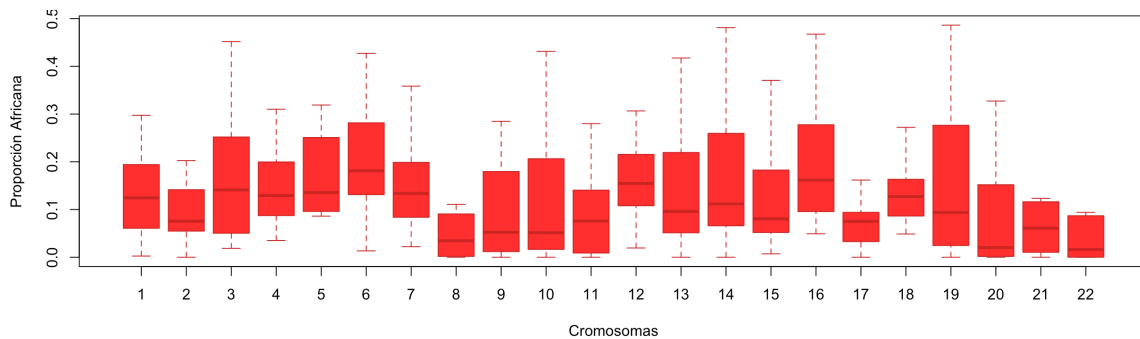


Figura 5. Boxplot que muestra la proporción de ancestría global AFR por cromosoma, sin apreciarse diferencias significativas.

Ancestría Local

A través del análisis de ancestría local fue posible identificar un segmento de ancestría africana, en al menos uno de sus cromosomas, en todos los individuos portadores de la mutación. Esta región de ancestría local africana tiene una extensión de 1.1Mb y flanquea la región repetidos CAG/CTG del gen *JPH3* a -767 y 345Kb (Figura 6B Y 6C). Utilizando la información faseada, fue posible identificar un haplotipo común entre todos los individuos con mutación con una longitud de 746kb y el cual se extiende a -430 y 316Kb alrededor de la mutación.

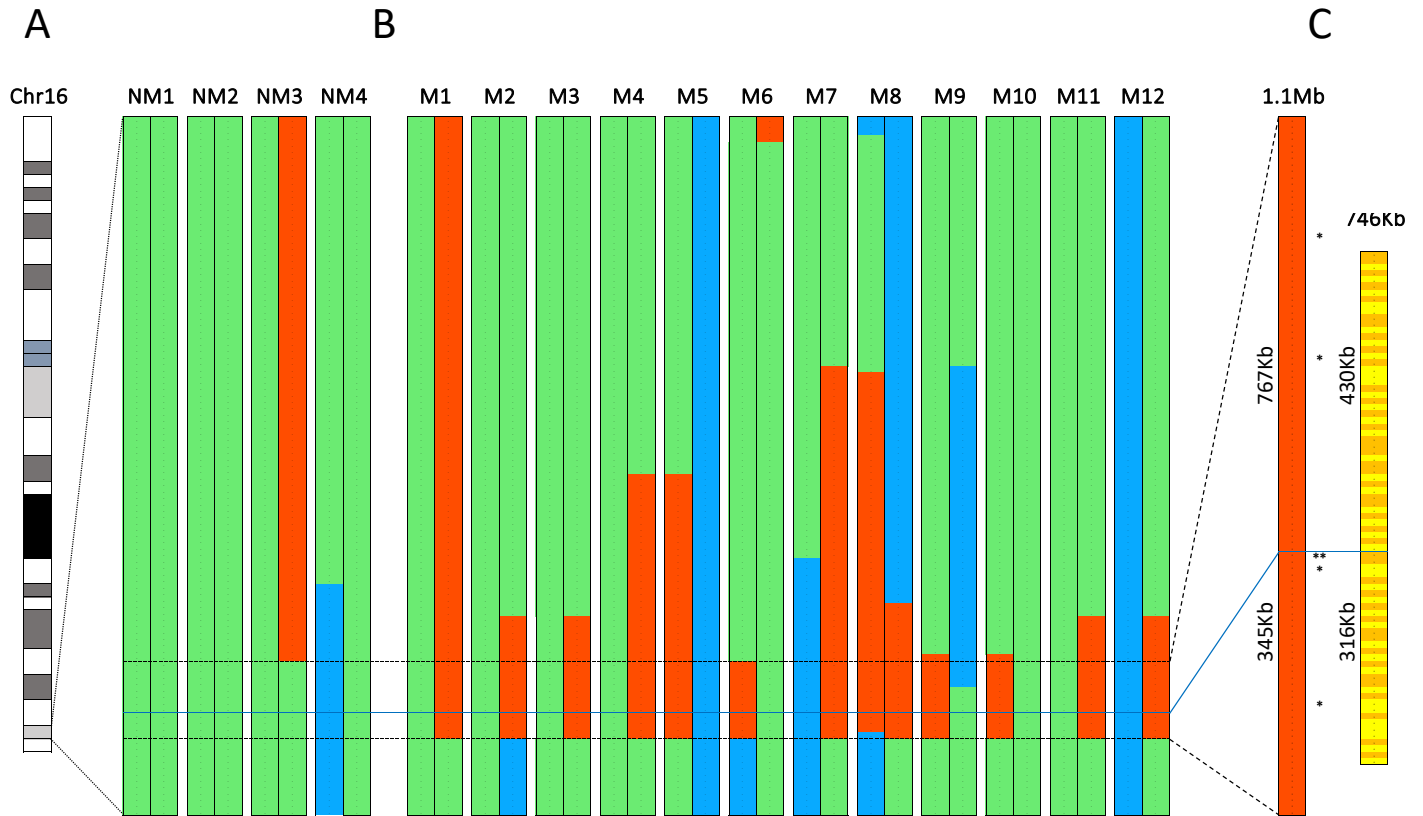


Figura 6. (A) Cromosoma 16. **(B)** Esquemática de la ascendencia local de la pareja de cromosomas 16 (16q24), en los 4 individuos sin mutación (NM) y los 12 sujetos con mutación (M). En rojo se esquematiza el componente AFR, en azul el componente EUR y en verde el componente NAT. La línea continua azul representa la posición de la mutación, las líneas discontinuas muestran la región de ascendencia africana mínima compartida entre todos los individuos con mutación. **(C)** Amplificación del bloque de ascendencia local AFR compartido entre todos los sujetos con mutación de 1.1Mb (líneas discontinuas); y en amarillo se muestra el bloque haplotípico compartido entre los 12 individuos con mutación de 746Kb (a -430 y 316Kb alrededor de la mutación). Los asteriscos representan las distancias de los marcadores SNPs y microsatélites previamente evaluados por Krause, et al.

Origen ancestral del haplotipo

a) Clasificación continental

En la figura 7, **A** y **B** se muestra el PCA en donde se incorpora el haplotipo común entre los individuos con mutación y los haplotipos de los individuos pertenecientes a las 3 poblaciones continentales de referencia AFR, EUR y NAT. En las Figuras 5, **C-F** se presenta la misma representación incorporando la estrategia de SMOTE-Tomek con y sin muestras sintéticas. Para asignar un origen ancestral al haplotipo a nivel continental se utilizó QDA. Se utilizaron 10,000 iteraciones, para cada una de estas iteraciones se asignó un origen ancestral con el algoritmo QDA para estimar la probabilidad de la asignación. Notablemente, en el 100% de las iteraciones el haplotipo se clasifica como AFR (Figura 8).

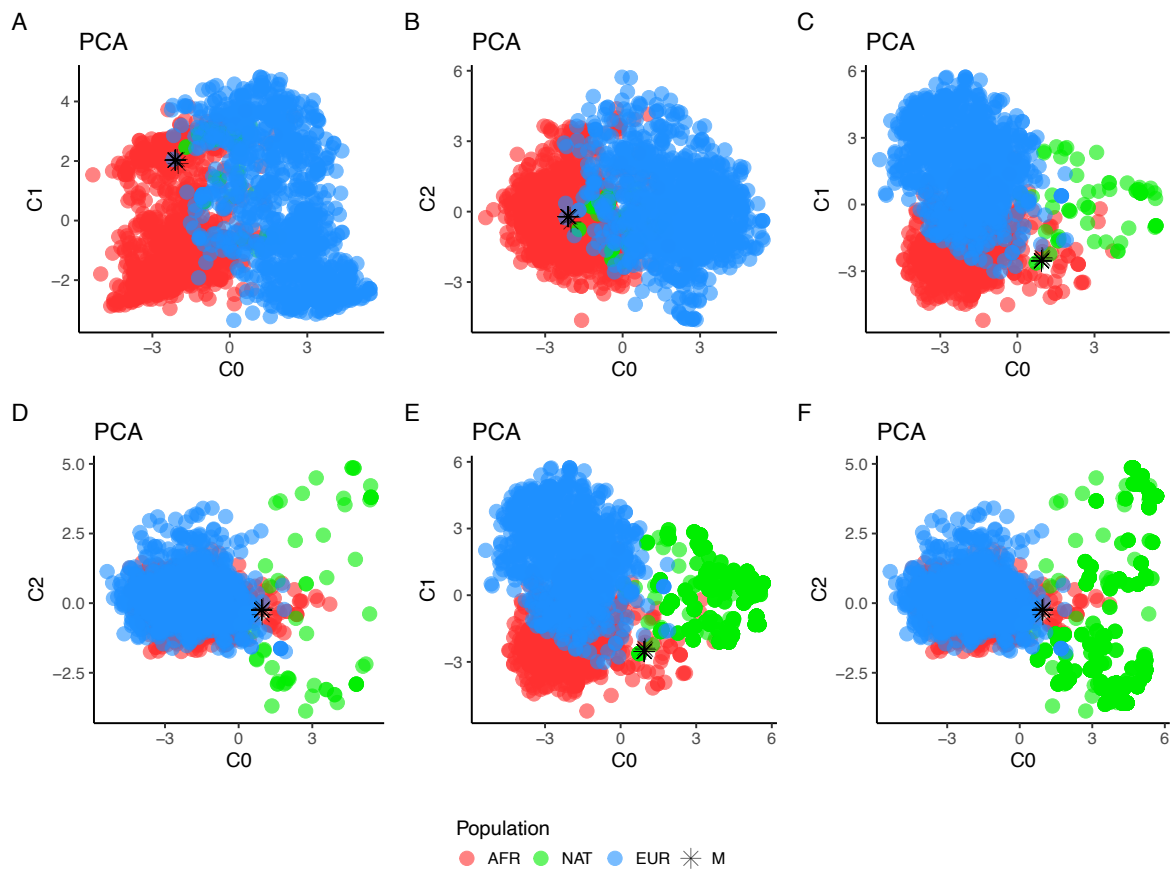


Figura 7. (A y B) PCA que muestran componente 0 vs componente 1 y 2, respectivamente. Se aprecia un agrupamiento de los sujetos con el haplotipo en la población AFR. (C-F) PCA con y sin muestras sintéticas por SMOTE-Tomek con agrupamiento de los sujetos con el haplotipo en la población AFR.

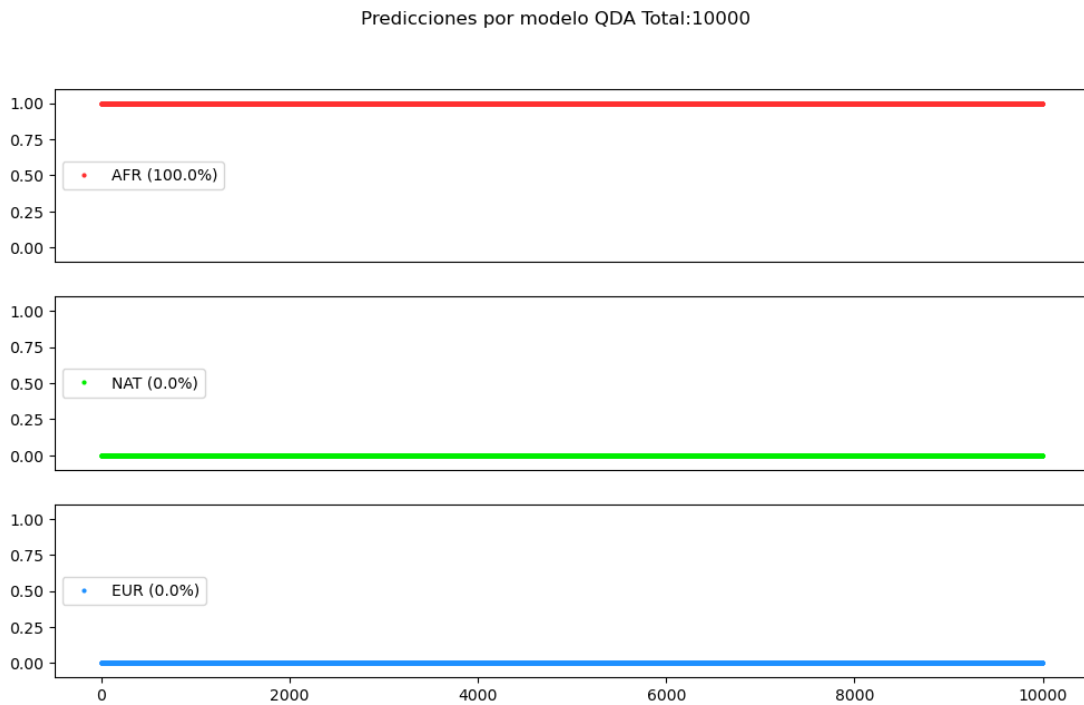


Figure 8. QDA continental del cromosoma con el haplotipo, mostrando una clasificación de las 10,000 iteraciones a la población AFR con una probabilidad del 100%.

b) Clasificación intracontinental

Asumiendo que el haplotipo es de origen africano, la pregunta sería a cuál de las poblaciones africanas tiene mayor afinidad. La Figura 9 (A-F) muestra los PCAs en donde se incorpora el haplotipo común entre los individuos con mutación y los

haplotipos de los individuos pertenecientes a las poblaciones africanas YRI, GWD, MSL, ESN y LWK.

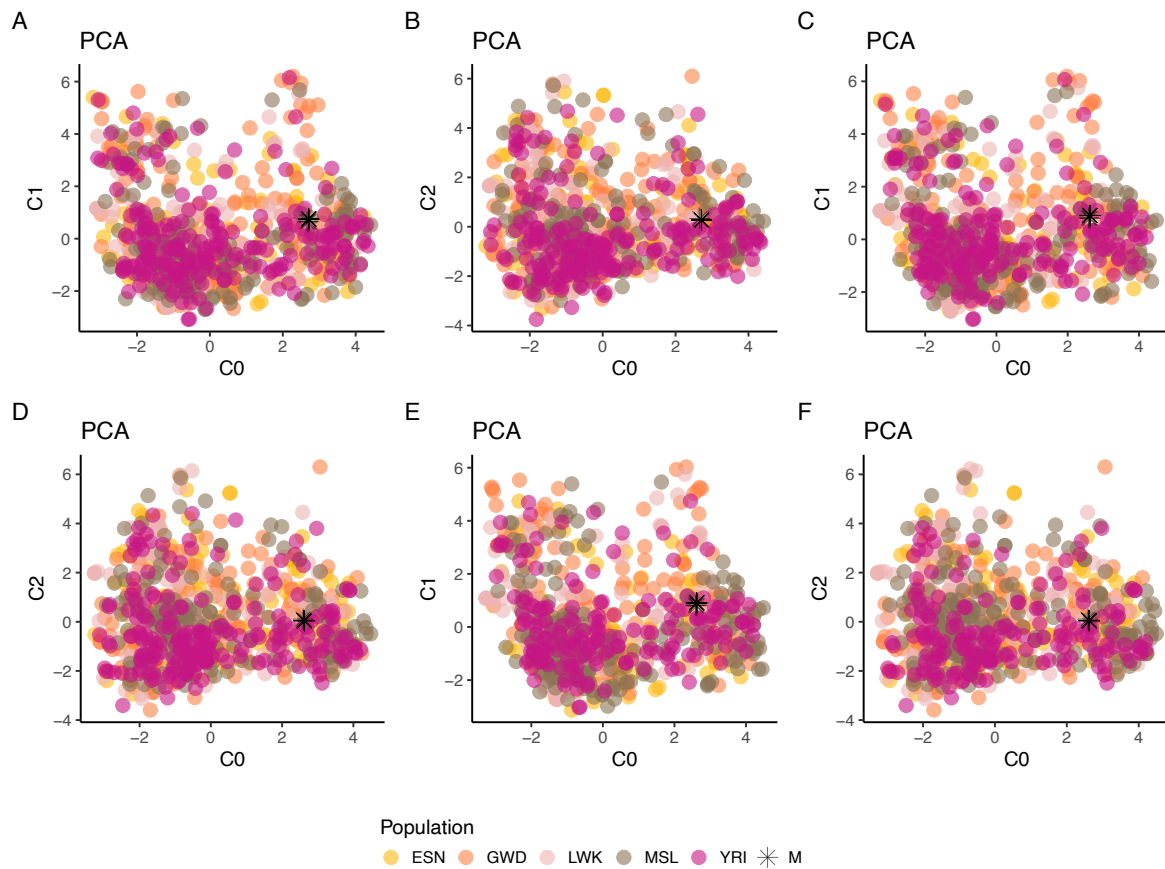


Figura 9. (A y B) PCA que muestran componente 0 vs componente 1 y 2, respectivamente entre los individuos con haplotipo y las subpoblaciones AFR. (C-F) PCA sin y con muestras sintéticas por SMOTE-Tomek sin lograr un agrupamiento específico de los sujetos con el haplotipo y las poblaciones AFR.

Siguiendo el mismo procedimiento, Para asignar un origen ancestral al haplotipo a nivel intracontinental se utilizó QDA con 10,000 iteraciones. En este caso, en el 78% de las iteraciones el haplotipo de interés se clasifica como YRI, seguido de GWD, MSL, ESN y LWK con probabilidades de 19, 8.53, 2.3 y 0.06%, respectivamente (Figura 10).

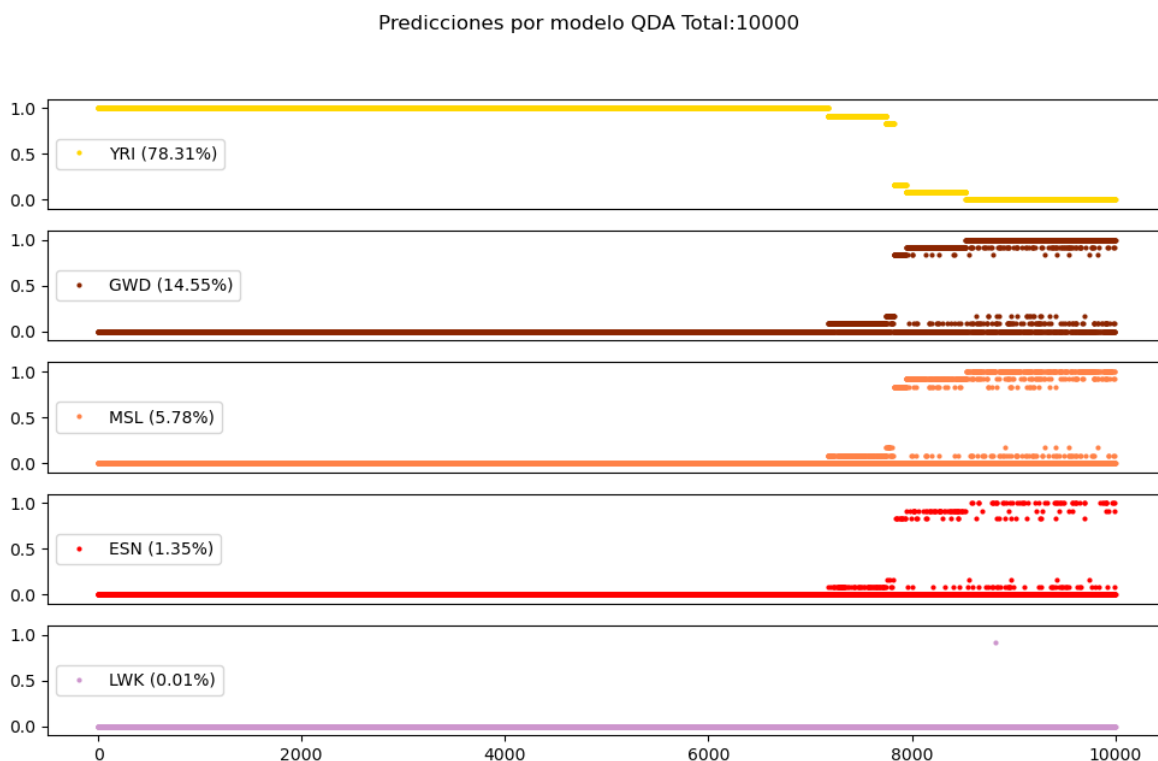


Figura 10. QDA intracontinental del haplotipo con la mutación, donde se muestran las probabilidades de clasificación por cada modelo generado, se aprecia una mayor probabilidad de clasificación a la población YRI (70%) y menores de forma descendente para las poblaciones GWD, MSL, ESN y LWK.

Haplotipo común

Se comparó el haplotipo de interés con los haplotipos observados en las poblaciones de referencia AFR y EUR de 1KGP, y NAT para evaluar la similitud entre los haplotipos. La Figura 10 muestra el haplotipo identificado en los individuos con mutación tiene proporcionalmente mayor similitud a los haplotipos de la población AFR de referencia que a los EUR o NAT.

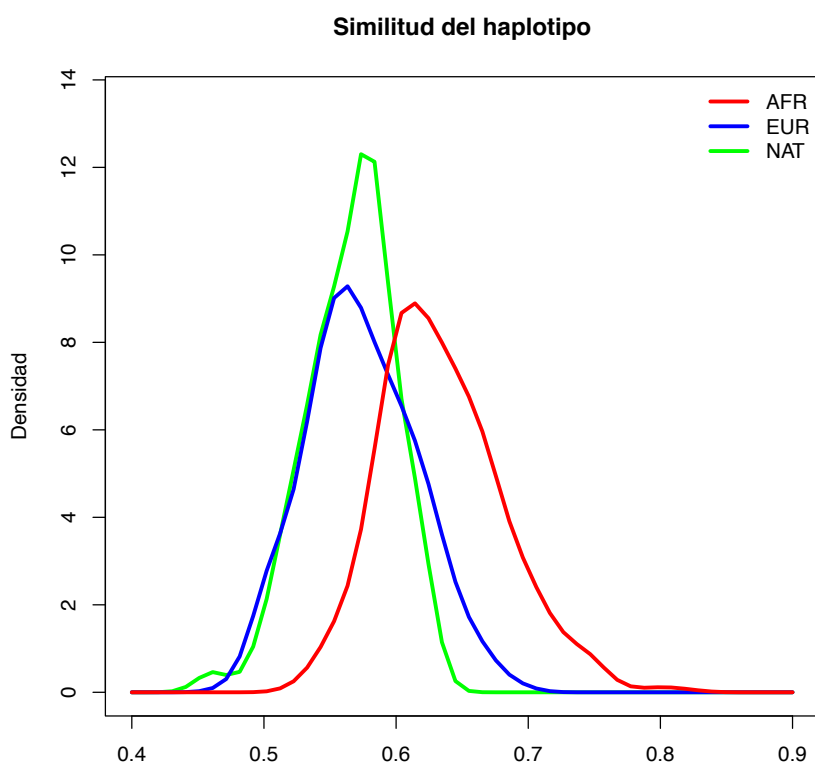


Figura 11. Similitud del haplotipo común con respecto a los haplotipos encontrados en las poblaciones de referencia AFR, EUR y NAT.

Contenido génico del haplotipo

El haplotipo común identificado en los portadores de la mutación tiene una extensión que va de -430 y 316Kb alrededor de la mutación (Chr16:87,178,517-87,949,385). La búsqueda en Ensembl, de dicha región, se encuentran a los genes *C16orf95*, *FBXO31*, *MAP1LC3B*, *ZCCHC14*, *KLHDC4*, *SLC7A5*, *CA5A* y *BANP*. Los cuales codifican para los productos: proteína del marco abierto de lectura 95 del cromosoma 16, proteína 31F-box (componente del complejo de ubiquitinación SCF), proteína asociada a microtúbulos 1 Cadena ligera 3 Beta (es una subunidad de las proteínas MAP1A y MAP1B asociadas a los microtúbulos neuronales), proteína del anillo de zinc tipo CCHC containing 14 (permite la actividad de unión de ácidos nucleicos), proteína del dominio de Kelch containing 4 (asociada a diversas funciones celulares, incluida migración celular, conformación del citoesqueleto, degradación de proteínas y la expresión génica), proteína miembro 5 portadora de soluto de la Familia 7 (involucrada en el transporte de ácido carboxílico, de hormona tiroideas y transporte de xenobióticos), la enzima anhidrasa carbónica 5A (cataliza de manera reversible la hidratación del dióxido de carbono) y la proteína nuclear asociada a BTG3 (forma un complejo con p53 y regula negativamente la transcripción de éste, funcionando como supresor de tumores y regulador del ciclo celular), respectivamente.

La búsqueda intencionada en PubMed, de posibles asociaciones en la patogénesis del HDL2, muestra que al momento ninguno de estos genes se ha relacionado con el desarrollo de una patología neurodegenerativa con trastornos del movimiento. Asimismo los modelos de análisis de interacción proteica no sustentan una interrelación con Junctofilina 3.

DISCUSIÓN

El HDL2 es un trastorno neurodegenerativo de muy baja frecuencia y solo se han identificado 69 casos alrededor del mundo^[66]. Sin embargo, HDL2 representa la primera causa de fenocopias de EH en América Latina^[95 96 97]. En este estudio describimos 9 casos de HDL2 e identificamos a 3 portadores asintomáticos de la mutación por expansión en el gen *JPH3* (ver sección de consideraciones éticas), pertenecientes a 5 genealogías. Las principales manifestaciones clínicas identificadas en los individuos afectados fueron: alteraciones psiquiátricas en el 100%, disartria 88%, corea 88%, demencia 77% y distonía 55%; mientras que en la revisión sistemática de Anderson et al. ^[66] se describen con porcentajes de 93%, 100%, 84%, 98% y 100%, respectivamente. Sin embargo, es importante señalar que no todos los sujetos contaban con la evaluación en todos estos rubros, por lo que se puede sobreestimar la proporción.

De manera consistente, en los diversos reportes de individuos afectados por HDL2, se atribuye una ascendencia africana, bien sea por la presencia de rasgos físicos distintivos de la población o a marcadores genéticos^[98 99 100]. Por su relevancia destacan 2 reportes previos, uno por Santos et al.^[71] de 2008 en Brasil, donde se describe a un individuo de rasgos antropofísicos y aparente ascendencia caucásica con mutación en *JPH3*, el cual fue evaluado mediante 4 marcadores SNPs río abajo de la mutación (a 0.9, 4.0, 4.1 y 5.9Kb) y apreciando que tales marcadores son representativos de población africana; y otro por Krause, et al. en 2015^[101], donde se evaluaron 31 muestras de sujetos no relacionados con HDL2 provenientes de 4 diferentes regiones geográficas (incluyendo a 3 sujetos mexicanos), a través de 3 marcadores SNPs (a -1.4, 1.6 y 40Kb) y 3 marcadores microsatélite (a -500,-300 y 256 Kb) alrededor de la mutación, apreciando que dichos marcadores conformaban un haplotipo de origen africano entre todos los sujetos con HDL2; por nuestra parte, identificamos un segmento de ancestría africana que flanquea la mutación y se comparte entre todos los individuos portadores de la mutación, de una longitud aproximada de 1.1Mb (-762 y 341 Kb). Además, el haplotipo común entre los

individuos con la mutación es de aproximadamente 746 Kb (-430 y 316Kb). Estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

Previamente en México, dos estudios describieron a tres individuos afectados de una misma familia que venían de la región suroeste de México sin precisar el lugar de origen^[102 103]. Interesantemente, en nuestra muestra de estudio, todos los sujetos con la mutación son originarios de la misma región suroeste del país llamada Costa Chica. Además, observamos una mayor proporción de ascendencia africana global en la muestra (16.26%), lo que representa 2,5 veces más de lo esperado para la población general de las distintas regiones de nuestro país^[104 105]. Esto en términos antropológicos, constata que la población mestizo-mexicana es una población de reciente formación que se originó de la mezcla de poblaciones que se mantuvieron geográficamente separadas por un extenso periodo de tiempo.

En nuestro trabajo, estimamos que el haplotipo común compartido entre los portadores de la mutación es de origen africano, específicamente de la población africana Yoruba (África centro-occidental). Este hecho es consistente con el movimiento intercontinental de 400 años de antigüedad del comercio de esclavos de África a varias regiones de las Américas. De acuerdo con la base de datos *slavevoyages* ^[106], se estima que más de un millón de esclavos fueron enviados desde varias regiones de África (Costa Dorada, Sierra Leona, la Costa Windward, la Ensenada de Benin, la Ensenada de Biafra, Africa centro-occidental y Santa Helena) hacia a colonias de control español, y de los cuales, solo 884 mil lograron desembarcar. De entre estos, cerca de 325 mil procedían de la región Centro-Occidental de África (África Centro-Occidental y Santa Helena), representando las regiones que aportaron el mayor número de personas esclavizadas a los territorios de la corona española (Cuba, Puerto Rico, el Caribe español , Río de la Plata, entre otros). Además, hubo movimiento de esclavos dentro del continente, con un estimado de 177 mil más que ingresaron a las tierras de la América española.

Como en el HDL2, otras patologías neurodegenerativas debidas a mutaciones dinámicas, muestran una mayor prevalencia en ciertas zonas geográficas e inclusive algunas han mostrado ser específicas para algunas poblaciones. Ejemplo de ello son: a) la *atrofia Dentato-rubro-palido-Luisiana* (DRLPA) la cual muestra una alta frecuencia en población asiática, principalmente Japón; [107] b) la *ataxia espino-cerebelosa tipo 10* (SCA10) donde se mantienen la hipótesis de un origen ancestral proveniente del Este de Asia y que se distribuyó hacia las Américas a través de las migraciones por aquellos individuos que cruzaron el estrecho de Behring; [108 109] c) la *ataxia espino-cerebelosa tipo 3* (SCA3), que tiene un haplotipo con posible origen ancestral del Este de Asia alrededor de 8,000 a 17,000 años atrás y que se distribuyó alrededor del mundo producto de las migraciones; [110 111] y por último, d) la *enfermedad de Huntington*, que muestra mayor frecuencia y se le atribuye un origen europeo. [112 113] Finalmente, consideramos que, además de la posible contribución de la ancestría genética en las patologías por mutaciones dinámicas, es importante considerar la posible existencia de otros factores en *cis* o en *trans* que predisponen al desarrollo de las expansiones y que de la misma forma su frecuencia poblacional podría contribuir al riesgo de desarrollo de la patología. Un posible ejemplo de ello, ha sido el SNP rs7158733 (alelo TAA) en la SCA3, en la que la presencia de este se encuentra asociado a la presencia de alelos expandidos [114]. Por lo que, un amplio estudio de estas regiones genómicas en las patologías por mutaciones dinámicas, proporcionará mayor información sobre su patogénesis.

CONCLUSIONES

En nuestro estudio, describimos la conformación genómica ancestral de 12 individuos con mutación por la expansión de repetidos CAG en el gen *JPH3* (9 de ellos con cuadro clínico manifiesto de HDL2). El origen geográfico de los individuos con mutación corresponde a la región pacífico sur del país conocida como Costa Chica (estados de Guerrero y Oaxaca). Identificamos una región mínima compartida de ancestría local y un haplotipo común en todos los sujetos con mutación en *JPH3*, con una extensión de 1.1Mb y de 746 kb, respectivamente. A través de la implementación de machine learning, proponemos que el posible origen ancestral de la región genómica que conforma el haplotipo proviene de la región centro-occidental de África (población Yoruba), dicho hallazgo es compatible con los registros de la movilización de la población africana hacia nuestro continente.

LIMITACIONES

A pesar de haber contado con una herramienta de análisis genómico, que permite el estudio de miles de variantes genéticas y ayuda a hacer estimaciones de mayor precisión, consideramos que la baja frecuencia de esta entidad clínica no nos permitió contar con muestra de estudio más grande; por lo que, para poder transpolar nuestros datos a todos aquellos otros sujetos con HDL2, se requiere incluir individuos de otras regiones del mundo. Por otro lado, la estimación del posible origen del haplotipo fue realizada con los datos de 5 poblaciones de referencia de origen africano, lo cual podría limitar la precisión de dicha estimación.

PERSPECTIVAS

Contemplamos seguir estudiando esta entidad clínica, ya que hemos seguido identificando nuevos casos de HDL2 que llegan al INNN. Lo que nos hace pensar

que en la región de la Costa Chica existe un número mayor de individuos afectados, por lo que se requieren estudios de campo y el poder compartir la información a la comunidad científica y autoridades sanitarias, para que se pueda impactar en la posibilidad de apoyo a las comunidades y se generen estrategias de salud pública para estos pacientes que cursan con este trastorno neurodegenerativo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La investigación se desarrolló con apego a la Declaración de Helsinki última revisión Brasil 2013¹¹⁵ y de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud¹¹⁶ en su Artículo 17, el proyecto correspondió a una investigación con riesgo mínimo, en el que se estipula procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: extracción de sangre por punción venosa en adultos y volumen máximo de 450mL.

Con la finalidad de mantener en resguardo la confidencialidad y posible identificación de los sujetos asintomáticos portadores de la mutación en *JPH3* se omitió la descripción de todos los sujetos sin manifestaciones en los árboles genealógicos (tanto los 3 con mutación, como los 4 sin mutación). A todos los participantes asintomáticos se les informó que la evaluación de la región de expandidos CAG/CTG fue únicamente con fines de investigación y en caso de desear conocer su posible estatus de portador de la mutación tendrían que llevar un abordaje a través del programa de diagnóstico presintomático en nuestra institución.

ANEXOS (Carta de consentimiento informado)



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

CONSENTIMIENTO INFORMADO
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

FECHA: ___/___/___

Determinación de marcadores de ancestría genética de pacientes mexicanos con el fenotipo 2 similar a la enfermedad de Huntington

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 la ancestría genética (componente biológico poblacional) de pacientes con diagnóstico confirmatorio de fenotipo 2 similar a la enfermedad de Huntington (HDL2, por sus siglas en inglés).
2. Las evaluaciones a realizar en el presente proyecto son: *escala unificada de rangos para enfermedad de Huntington* (UHDRS, en inglés) y toma de muestra de sangre periférica para la evaluación de marcadores biológicos en el ADN (material hereditario) de aquellos individuos con el diagnóstico de HDL2 y de individuos sanos pertenecientes a las familias de aquellos miembros afectados, para determinar el componente poblacional. Asimismo, se evaluará el tamaño de repetidos CAG del gen *JPH3* en individuos sanos y de aquellos con sospecha diagnóstica.
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 con la finalidad de evaluar los marcadores biológicos antes mencionados.
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. Además, he sido informado que no recibiré resultados de los análisis que se realizarán debido a que no tienen utilidad clínica o terapéutica, sino que sólo tienen utilidad de investigación.
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 Gómez al teléfono 56 06 38 22 Ext. 3041. También se puede dirigir con el Dr. Antonio Torres Ruíz, 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

- ¹ 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.
- ² Walker RH. Chorea. *Continuum*. 2013;1242-1263.
- ³ Burgunder JM. Genetics of Huntington's disease and related disorders. *Drug Discov Today*. 2014;19(7):985-989.
- ⁴ Kim SD, Fung VS. An update on Huntington's disease: from the gene to the clinic. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(4):477-483.
- ⁵ Roos R. Huntington Disease: A Clinical Review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010; 5: 40-48.
- ⁶ 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.
- ⁷ 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 Oct 15;24(13):2012-5. doi: 10.1002/mds.22737. PMID: 19672992.
- ⁸ 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.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ Medina A, Mahjoub Y, Shaver L, Pringsheim T. Prevalence and Incidence of Huntington's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Mov Disord*. 2022 Sep 26. doi: 10.1002/mds.29228.
- ¹¹ Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 2011;10:83–98.
- ¹² 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.
- ¹³ Quarrell OWJ, Brewer HM, Squiteri F, Barker RA, Nance MA, Landwehrmeyer B: *Juvenile Huntington's disease*. Oxford University Press; 2009.
- ¹⁴ Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007 20;369(9557):218-228.
- ¹⁵ Huntington Study Group. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and-consistency. *Mov Disord* 1996;11:136–142.
- ¹⁶ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/document.cgi?study_id=phs000222.v3.p2&phd=2387
- ¹⁷ Montoya A, Price BH, Menear M y Lepage M. Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *J Psychiatry Neurosci*. 2006; 31(1): 21–29.

-
- ¹⁸ Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington disease. *The American journal of psychiatry* 2005;162(4):725-31.
- ¹⁹ 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.
- ²⁰ 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.
- ²¹ 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.
- ²² Keckarević M, Savić D, Svetel M, Kostić V, Vukosavić S, Romac S. Yugoslav EH phenocopies analyzed on the presence of mutations in PrP, ferritin, and Jp-3 genes. *Int J Neurosci.* 2005;115(2):299-301.
- ²³ Rodrigues GR, Walker RH, Bader B, Danek A, Brice A, Cazeneuve C, Russaouen O, Lopes-Cendes I, Marques W Jr, Tumas V. Clinical and genetic analysis of 29 Brazilian patients with Huntington's disease-like phenotype. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011 Jun;69(3):419-23.
- ²⁴ Gövert F, Schneider SA. Huntington's disease and Huntington's disease-like syndromes: an overview. *Curr Opin Neurol.* 2013;26(4):420-7.
- ²⁵ Moore RC, et al. Huntington disease phenocopy is a familial prion disease. *Am J Hum Genet.* 2001;69: 1385–1388.
- ²⁶ 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.
- ²⁷ 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.
- ²⁸ 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.
- ²⁹ 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.
- ³⁰ 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.
- ³¹ 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.
- ³² Walker RH, Jung HH, Dobson-Stone C, Rampoldi L, Sano A, et al. Neurologic phenotypes associated with acanthocytosis. *Neurology.* 2007;68:92–98.
- ³³ 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 2018).
- ³⁴ 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.

-
- ³⁵ 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.
- ³⁶ 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.
- ³⁷ 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.
- ³⁸ 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.
- ³⁹ Grimes DA, et al. Late adult onset chorea with typical pathology of Hallervorden–Spatz syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;69: 392–395.
- ⁴⁰ 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.
- ⁴¹ 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.
- ⁴² 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.
- ⁴³ 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.
- ⁴⁴ 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.
- ⁴⁵ Tan EK, Ashizawa T. Genetic testing in spinocerebellar ataxias: defining a clinical role. *Arch Neurol.* 2001;58(2):191-195.
- ⁴⁶ 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.
- ⁴⁷ 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.
- ⁴⁸ 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.

-
- ⁴⁹ 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.
- ⁵⁰ 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.
- ⁵¹ 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.
- ⁵² 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.
- ⁵³ 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.
- ⁵⁴ 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.
- ⁵⁵ Namekawa M, Takiyama Y, Ando Y, et al. Choreiform movements in spinocerebellar ataxia type 1. *J Neurol Sci*. 2001;187:103–106.
- ⁵⁶ 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.
- ⁵⁷ 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.
- ⁵⁸ 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.
- ⁵⁹ Durr A: Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 2010;9: 885–894.
- ⁶⁰ Margolis RL, O'Hearn E, Rosenblatt A, Willour V, Holmes SE, Franz ML, Callahan C, Hwang HS, Troncoso JC, Ross CA. A disorder similar to Huntington's disease is associated with a novel CAG repeat expansion. *Ann Neurol*. 2001 Dec;50(6):373-80.
- ⁶¹ Garbino A, van Oort RJ, Dixit SS, Landstrom AP, Ackerman MJ, Wehrens XH. Molecular evolution of the junctophilin gene family. *Physiol Genomics*. 2009 May 13;37(3):175-86. doi: 10.1152/physiolgenomics.00017.2009.
- ⁶² Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, Callahan C, Hwang HS, Ingersoll-Ashworth RG, Fleisher A, Stevanin G, Brice A, Potter NT, Ross CA, Margolis RL. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet*. 2001 Dec;29(4):377-8.
- ⁶³ Margolis RL, Rudnicki DD, Holmes SE. Huntington's disease like-2: review and update. *Acta Neurol Taiwan*. 2005;14(1):1-8.
- ⁶⁴ Rudnicki DD, Holmes SE, Lin MW, Thornton CA, Ross CA, Margolis RL. Huntington's disease--like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci. *Ann Neurol*. 2007;61(3):272-82.

-
- ⁶⁵ Margolis RL, Holmes SE, Rosenblatt A, Gourley L, O'Hearn E, Ross CA, Seltzer WK, Walker RH, Ashizawa T, Rasmussen A, Hayden M, Almqvist EW, Harris J, Fahn S, MacDonald ME, Mysore J, Shimohata T, Tsuji S, Potter N, Nakaso K, Adachi Y, Nakashima K, Bird T, Krause A, Greenstein P. Huntington's Disease-like 2 (HDL2) in North America and Japan. *Ann Neurol*. 2004;56(5):670-4.
- ⁶⁶ Anderson DG, Walker RH, Connor M, Carr J, Margolis RL, Krause A. A Systematic Review of the Huntington Disease-Like 2 Phenotype. *J Huntingtons Dis*. 2017;6(1):37-46. doi: 10.3233/JHD-160232.
- ⁶⁷ Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, Callahan C, Hwang HS, Ingersoll-Ashworth RG, Fleisher A, Stevanin G, Brice A, Potter NT, Ross CA, Margolis RL. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet*. 2001 Dec;29(4):377-8.
- ⁶⁸ Bauer I, Gencik M, Laccone F, Peters H, Weber BH, Feder EH, Weirich H, Morris-Rosendahl DJ, Rolfs A, Gencikova A, Bauer P, Wenning GK, Epplen JT, Holmes SE, Margolis RL, Ross CA, Riess O. Trinucleotide repeat expansions in the junctophilin-3 gene are not found in Caucasian patients with a Huntington's disease-like phenotype. *Ann Neurol*. 2002;51(5):662.
- ⁶⁹ Stevanin G, Camuzat A, Holmes SE, et al. CAG/CTG repeat expansions at the Huntington's disease-like 2 locus are rare in Huntington's disease patients. *Neurology* 2002;58:965–967.
- ⁷⁰ Keckarevic M., Savic D. and Romac S. JP-3 gene polymorphism in healthy population of Serbia and Montenegro. *J. Genet*. 2005;84, 69–71.
- ⁷¹ Santos C, Wanderley H, Vedolin L, Pena SD, Jardim L, Sequeiros J. Huntington disease-like 2: the first patient with apparent European ancestry. *Clin Genet*. 2008 May;73(5):480-485.
- ⁷² Ramírez García, Miguel Ángel. Frecuencia de mutaciones en los genes ATXN1, ATXN2, ATXN3 y FXN en fenocopias de la enfermedad de Huntington de población mexicana / 2017. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/CF32DJ2381X9LHG4B8NB5XRNF3YESBRSLPN7IQMD25FBUCSTFY-10559?func=full-set-set&set_number=334508&set_entry=000001&format=037
- ⁷³ Abecasis G, Bustamante CD, Ostrander EA, Scherer SW, Chanock SJ, et al. Human Genome Variation 2006: Emerging views on structural variation and large-scale SNP analysis. *Nature Genetics* 2007; 39 (2):153-155.
- ⁷⁴ 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 ;526(7571):68-74.
- ⁷⁵ Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ et al. The distribution of human genetic diversity: A comparison of mitochondrial, autosomal, and y-chromosome data. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 979-988.
- ⁷⁶ Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-59.
- ⁷⁷ Suarez-Pajes E, Díaz-de Usera A, Marcelino-Rodríguez I, Guillen-Guio B, Flores C. Genetic Ancestry Inference and Its Application for the Genetic Mapping of Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 28;22(13):6962. doi: 10.3390/ijms22136962.
- ⁷⁸ Loh PR, Lipson M, Patterson N, Moorjani P, Pickrell JK, Reich D, Berger B. Inferring admixture histories of human populations using linkage disequilibrium. *Genetics*. 2013 Apr;193(4):1233-54. doi: 10.1534/genetics.112.147330.

-
- ⁷⁹ Mani A. Local Ancestry Association, Admixture Mapping, and Ongoing Challenges. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017 Apr;10(2):e001747. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.117.001747.
- ⁸⁰ Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet*. 2005;37(5):549-54.
- ⁸¹ Gorodezky C AC, Vazquez-Garcia MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Perez-Luque E, Muñoz L. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: Tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Human Immunology* 2001; 62 (9): 979-991.
- ⁸² Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M4, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*. 2014;344(6189):1280-5.
- ⁸³ <https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/multi-ethnic-global-data-sheet-370-2016-001.pdf>
- ⁸⁴ <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/iscan-data-sheet-970-2011-004.pdf>
- ⁸⁵ Bien SA, Wojcik GL, Zubair N, Gignoux CR, Martin AR, Kocarnik JM, et al. Strategies for Enriching Variant Coverage in Candidate Disease Loci on a Multiethnic Genotyping Array. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167758.
- ⁸⁶ Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):559-75.
- ⁸⁷ Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M4, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*. 2014;344(6189):1280-5.
- ⁸⁸ Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*. 2009;19(9):1655-64.
- ⁸⁹ Browning BL, Zhou Y, Browning SR. A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels. *Am J Hum Genet*. 2018;103(3):338-348.
- ⁹⁰ Maples BK, Gravel S, Kenny EE, Bustamante CD. RFMix: a discriminative modeling approach for rapid and robust local-ancestry inference. *Am J Hum Genet*. 2013;93(2):278-88.
- ⁹¹ Batista G, Bazzan A, Monard M. Balancing Training Data for Automated Annotation of Keywords: a Case Study. *Journal of artificial intelligence research*, 3 (2) (2003), pp. 15-20.
- ⁹² https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Overview?r=16:87178517-87949385;db=core
- ⁹³ <https://string-db.org>
- ⁹⁴ <http://www.interactome-atlas.org>
- ⁹⁵ Rodrigues GR, Walker RH, Bader B, Danek A, Brice A, Cazeneuve C, Russaouen O, Lopes-Cendes I, Marques W Jr, Tumas V. Clinical and genetic analysis of 29 Brazilian patients with Huntington's disease-like phenotype. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011 Jun;69(3):419-23.

-
- ⁹⁶ Paradisi I, Ikonomu V, Arias S. Huntington disease-like 2 (HDL2) in Venezuela: frequency and ethnic origin. *J Hum Genet.* 2013 Jan;58(1):3-6.
- ⁹⁷ Walker RH, Gatto EM, Bustamante ML, Bernal-Pacheco O, Cardoso F, Castilhos RM, Chana-Cuevas P, Cornejo-Olivas M, Estrada-Bellmann I, Jardim LB, López-Castellanos R, López-Contreras R, Maia DP, Mazzetti P, Miranda M, Rodríguez-Violante M, Teive H, Tumas V. Huntington's disease-like disorders in Latin America and the Caribbean. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018 Aug;53:10-20. doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.05.021.
- ⁹⁸ Magazi DS, Krause A, Bonev V, Moagi M, Iqbal Z, Dlodla M, van der Meyden CH. Huntington's disease: genetic heterogeneity in black African patients. *S Afr Med J.* 2008 Mar;98(3):200-3.
- ⁹⁹ Bardien S, Abrahams F, Soodyall H, van der Merwe L, Greenberg J, Brink T, Carr J. A South African mixed ancestry family with Huntington disease-like 2: clinical and genetic features. *Mov Disord.* 2007 Oct 31;22(14):2083-9.
- ¹⁰⁰ Castilhos RM, Souza AF, Furtado GV, Gheno TC, Silva AL, Vargas FR, Lima MA, Barsottini O, Pedroso JL, Godeiro C Jr, Salarini D, Pereira ET, Lin K, Toralles MB, Saute JA, Rieder CR, Quintas M, Sequeiros J, Alonso I, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clin Genet.* 2014 Oct;86(4):373-7.
- ¹⁰¹ Krause A, Mitchell C, Essop F, Tager S, Temlett J, Stevanin G, Ross C, Rudnicki D, Margolis R. Junctophilin 3 (JPH3) expansion mutations causing Huntington disease-like 2 (HDL2) are common in South African patients with African ancestry and a Huntington disease phenotype. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015 Oct;168(7):573-85. doi: 10.1002/ajmg.b.32332.
- ¹⁰² Margolis RL, Holmes SE, Rosenblatt A, Gourley L, O'Hearn E, Ross CA, Seltzer WK, Walker RH, Ashizawa T, Rasmussen A, Hayden M, Almqvist EW, Harris J, Fahn S, MacDonald ME, Mysore J, Shimohata T, Tsuji S, Potter N, Nakaso K, Adachi Y, Nakashima K, Bird T, Krause A, Greenstein P. Huntington's Disease-like 2 (HDL2) in North America and Japan. *Ann Neurol.* 2004 Nov;56(5):670-4.
- ¹⁰³ Walker RH, Rasmussen A, Rudnicki D, Holmes SE, Alonso E, Matsuura T, Ashizawa T, Davidoff-Feldman B, Margolis RL. Huntington's disease--like 2 can present as chorea-acanthocytosis. *Neurology.* 2003 Oct 14;61(7):1002-4.
- ¹⁰⁴ Martínez-Cortés G, Salazar-Flores J, Fernández-Rodríguez LG, Rubi-Castellanos R, Rodríguez-Loya C, Velarde-Félix JS, Muñoz-Valle JF, Parra-Rojas I, Rangel-Villalobos H. Admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on paternal lineages. *J Hum Genet.* 2012 Sep;57(9):568-74.
- ¹⁰⁵ Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M4, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science.* 2014;344(6189):1280-5.
- ¹⁰⁶ <https://www.slavevoyages.org/>
- ¹⁰⁷ Carroll LS, Massey TH, Wardle M, Peall KJ. Dentatorubral-pallidoluysian Atrophy: An Update. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y).* 2018 Oct 1;8:577.
- ¹⁰⁸ Wang K, McFarland KN, Liu J, Zeng D, Landrian I, Xia G, Hao Y, Jin M, Mulligan CJ, Gu W, Ashizawa T. Spinocerebellar ataxia type 10 in Chinese Han. *Neurol Genet.* 2015 Oct 8;1(3):e26.
- ¹⁰⁹ Naito H, Takahashi T, Kamada M, Morino H, Yoshino H, Hattori N, Maruyama H, Kawakami H, Matsumoto M. First report of a Japanese family with spinocerebellar ataxia type 10: The second report from Asia after a report from China. *PLoS One.* 2017 May 19;12(5):e0177955.

-
- ¹¹⁰ Martins S, Sequeiros J. Origins and Spread of Machado-Joseph Disease Ancestral Mutations Events. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1049:243-254.
- ¹¹¹ Li T, Martins S, Peng Y, Wang P, Hou X, Chen Z, Wang C, Tang Z, Qiu R, Chen C, Hu Z, Xia K, Tang B, Sequeiros J, Jiang H. Is the High Frequency of Machado-Joseph Disease in China Due to New Mutational Origins? *Front Genet.* 2019 Feb 20;9:740.
- ¹¹² Warby SC, Montpetit A, Hayden AR, Carroll JB, Butland SL, Visscher H, Collins JA, Semaka A, Hudson TJ, Hayden MR. CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplogroup. *Am J Hum Genet.* 2009 Mar;84(3):351-66.
- ¹¹³ Warby SC, Visscher H, Collins JA, Doty CN, Carter C, Butland SL, Hayden AR, Kanazawa I, Ross CJ, Hayden MR. HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur J Hum Genet.* 2011 May;19(5):561-6.
- ¹¹⁴ Prudencio M, Garcia-Moreno H, Jansen-West KR, Al-Shaikh RH, Gendron TF, Heckman MG, Spiegel MR, Carlomagno Y, Daugherty LM, Song Y, Dunmore JA, Byron N, Oskarsson B, Nicholson KA, Staff NP, Gorcenco S, Puschmann A, Lemos J, Januário C, LeDoux MS, Friedman JH, Polke J, Labrum R, Shakkottai V, McLoughlin HS, Paulson HL, Konno T, Onodera O, Ikeuchi T, Tada M, Kakita A, Fryer JD, Karremo C, Gomes I, Caviness JN, Pittelkow MR, Aasly J, Pfeiffer RF, Veerappan V, Eggenberger ER, Freeman WD, Huang JF, Uitti RJ, Wierenga KJ, Marin Collazo IV, Tipton PW, van Gerpen JA, van Blitterswijk M, Bu G, Wszolek ZK, Giunti P, Petrucelli L. Toward allele-specific targeting therapy and pharmacodynamic marker for spinocerebellar ataxia type 3. *Sci Transl Med.* 2020 Oct 21;12(566):eabb7086. doi: 10.1126/scitranslmed.abb7086.
- ¹¹⁵ Declaración de Helsinki 2000.
(http://www.inb.unam.mx/bioetica/documentos/declaracion_helsinki.pdf)
- ¹¹⁶ Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
(<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>)