



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS DEL GEN *GRN* EN PACIENTES CON DEMENCIA FRONTOTEMPORAL (DFT) Y DEL GEN *C9ORF72* EN PACIENTES CON DFT Y ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. F. B. EDGAR SANDOVAL CORDERO

TUTOR PRINCIPAL

DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ
INSITITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL
VELASCO SUÁREZ"

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE, 2015



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.

**ANÁLISIS DEL GEN GRN EN PACIENTES CON DEMENCIA
FRONTOTEMPORAL (DFT) Y DEL GEN C9ORF72 EN PACIENTES CON DFT Y
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).**

Reconocimientos.

Bajo la dirección del Doctor Samuel Canizales Quinteros en el departamento de Genómica de poblaciones aplicada a la salud de la Facultad de Química, UNAM, en su unidad periférica del Instituto Nacional de Medicina Genómica se realizó esta tesis.

Se le reconoce a la Doctora Petra Yescas Gómez del departamento de Genética y Biología molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", su colaboración, apoyo y asesoría para la realización de la tesis.

El comité tutorial a cargo del asesoramiento de esta tesis estuvo conformado por:

Doctor Samuel Canizales Quinteros Facultad de Química, UNAM.

Doctora Petra Yescas Gómez Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Doctor José Pedraza Chaverri Facultad de Química, UNAM.

El jurado del examen de obtención de grado estuvo conformado por:

Presidente	Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta
Vocal	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Vocal	Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo
Vocal	Dr. Julio Morán Andrade
Secretaria	Dra. Patricia de Gortari Gallardo

Agradecimientos.

A todas las personas que confiaron en mí, que me brindaron su apoyo y siempre pudieron darme una palabra de aliento para seguir adelante, a pesar de que me haya separado un poco de ellas.

A mis padres por todo su cariño y todo el apoyo que me han dado en todo momento no tengo más que decirles que los amo mucho.

A mi hermano que siempre tuvo una palabra de aliento y un consejo para darme.

A mi novia Mónica que estuvo allí en todo momento para apoyarme, darme su cariño y amor. Te amo.

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros y a la Dra. Petra Yescas Gómez, que me brindaron todo su apoyo y asesorías para la realización de esta tesis, que sin su guía y conocimientos hubiera sido imposible.

A la Dra. Alonso por brindarme su apoyo y confianza.

A la Dra. Nancy Monroy que me apoyo con sus conocimientos y confianza en todo momento.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Neurología y Neurocirugía, que me apoyaron, me brindaron su amistad y con los cuales pude compartir penas y glorias.

A todos mis amigos por compartir tantos buenos momentos que sin ellos no podría haber logrado este gran paso en mi vida.

También al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP), por la beca brindada para asistir al congreso de Genética Humana.

Índice.

Índice de figuras.....	ii
Índice de tablas.....	iii
I. Abreviaturas.....	1
II. Resumen.....	3
III. Introducción.....	5
3.1 <i>Concepto de Demencia</i>	5
3.2 <i>Demencia Frontotemporal</i>	5
3.2.1 <i>Epidemiología</i>	6
3.1.2 <i>Características clínicas</i>	6
3.1.3 <i>Característica neuropatológicas</i>	8
3.1.4 <i>Etiología y genética de la Demencia Frontotemporal</i>	9
3.1.5 <i>El gen de la progranulina (GRN)</i>	9
3.2 <i>Esclerosis Lateral Amiotrófica</i>	14
3.2.1 <i>Epidemiología</i>	15
3.2.2 <i>Características Clínicas</i>	15
3.2.3 <i>Características neuropatológicas</i>	17
3.2.4 <i>Etiología y genética de la Esclerosis Lateral Amiotrófica</i>	18
3.2.5 <i>El gen C9ORF72</i>	¡Error! Marcador no definido.
IV. Planteamiento del Problema.....	30
V. Hipótesis.....	31
VI. Objetivo general.....	31
6.1 <i>Objetivos particulares</i>	31
VII. Diseño experimental.....	32
VIII. Resultados.....	38
8.1 <i>Variantes identificadas en el gen GRN</i>	38
8.2 <i>Variantes identificadas en C9orf72</i>	42
IX. Análisis de resultados.....	44
9.1 <i>GRN</i>	44
9.2 <i>C9orf72</i>	51
X. Conclusiones.....	52
XI. Bibliografía.....	53
XII. Apéndice.....	71

Índice de figuras.

Figura 1. Localización del gen GRN en la región cromosómica 17q21.32.....	10
Figura 2. Representación de la organización modular del gen GRN.....	10
Figura 3. Inclusiones patológicas de proteínas en casos con ELA y DFT	17
Figura 4. Los genes que más contribuyen al desarrollo de ELA y DFT	19
Figura 5. Localización del gen <i>C9orf72</i>	20
Figura 6. Visión general de la estructura genómica del locus C9ORF72.....	20
Figura 7. Se muestran los 3 mecanismos, por los que el expandido "GGGGCC" lleva al desarrollo de la DFT-ELA	23
Figura 8. Estructura del cuádruplex-G	25
Figura 9. A. Cuádruplex-G unimolecular. B. cuádruplex-G multimolecular	25
Figura 10. Algunos de los mecanismos por los cuales el RNA del repetido expandido realiza su función tóxica.....	29
Figura 11. Metodología general empleada en el estudio.....	32
Figura 12. Porcentaje de hombres y mujeres que pertenecen a la población de pacientes con Demencia Frontotemporal.....	33
Figura 13. Porcentaje de hombres y mujeres que pertenecen al grupo de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	34
Figura 14. Porcentaje de hombres y mujeres que cuales pertenecen al grupo control.....	34
Figura 15. Electroferograma parcial de c.88_89insC.....	38
Figura 16. Electroferogramas parciales de la mutación CM084962	39
Figura 17. Electroferogramas parciales del SNP rs5848 de.....	40
Figura 18. Electroferogramas parciales de la mutación p.A588T cambio.....	40
Figura 19. Electroferograma parcial de la secuencia reversa del expandido "CCCCGG".	42
Figura 20. Se observa la imagen de uno de los resultados que se obtuvieron de la reacción de fragmentos utilizando como marcador "500 LIZ™"	42
Figura 21. Proporción del polimorfismo rs17523519	44
Figura 22. Proporción del polimorfismo rs850713	45
Figura 23. Proporción del polimorfismo rs9897526	46
Figura 24. Proporción del polimorfismo rs5848.....	47
Figura 25. Se muestra el resultado del análisis <i>in silico</i> de la variante génica p.A588T por el programa PolyPhen-2.	49
Figura 26. Se muestra el resultado del análisis <i>in silico</i> por el programa PolyPhen-2, el cual muestra que la mutación CM084962	50

Índice de tablas.

Tabla 1. Se presenta el gen, su localización cromosómica, la proteína para la que codifica así como el % de participación en el desarrollo de la DFT	9
Tabla 2. Se presenta el gen, su localización cromosómica, la proteína para la que codifica así como el % de participación en el desarrollo de la DFT	18
Tabla 3. Localización y la neuropatología relativa de los tipos de proteínas que se obtienen de la traducción RAN del hexanucleótido.....	28
Tabla 4. Resumen de las variantes identificadas en el gen GRN y se observa como más de una variante se identifica en un solo paciente.....	41
Tabla 5. Promedio y rango del número de repetidos.....	43
Tabla 6. Resultado obtenido de "Translate tool"	48
Tabla 7. Reactivos que se emplearon en la elaboración de la PCR para el gen <i>GRN</i>	73
Tabla 8. Temperaturas y tiempos empleados para la PCR del gen <i>GRN</i>	73
Tabla 9. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados en la reacción de secuenciación.....	75
Tabla 10. Temperaturas y tiempos utilizados en la realización de la reacción de secuenciación.....	75
Tabla 11. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados en la reacción de análisis de fragmento.....	76
Tabla 12. Temperaturas y tiempos utilizadas en el análisis de fragmentos	77

I. Abreviaturas.

3R	Tres repetidos
4R	Cuatro repetidos
AD	Autosómico dominante
ADARB2	Activador de adenosina que actúa en RNAB2
ANG	Gen que codifica para la proteína angiogenina
APPNF	Afasia Progresiva Primaria No Fluente
APPNF-G	Afasia Progresiva Primaria No Fluente agramática
APPNF-L	Afasia Progresiva Primaria No Fluente logopéica
ATXN2	Gen que codifica para la proteína ataxina 2
BLGR	Buffer de lisis de glóbulos rojos
CHMP2B	Gen de la proteína multivesicular 2B
DFT	Demencia Frontotemporal
DFT-ELA	Demencia Frontotemporal asociada a la enfermedad de la neurona motora
DFT-FUS	Demencia Frontotemporal con inclusiones de la proteína FUS
DFT-TAU	Demencia Frontotemporal con inclusiones de tau
DFT-TDP	Demencia Frontotemporal con inclusiones de TDP-43
DFT-U	Demencia Frontotemporal con inclusiones de ubiquitina
DFTvc	Demencia Frontotemporal con cambios en la personalidad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Demencia Semántica
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EP	Enfermedad de Parkinson
FUS	Gen de la proteína fusionada en el sarcoma
GRN	Gen de la Progranulina

hnRNP	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea
KD	Kilo Dalton
<i>MAPT</i>	Gen de la proteína Asociada a microtúbulo
mRNA	RNA mensajero
miRNA	Micro RNA
NMI	Neurona Motora Inferior
NMS	Neurona Motora Superior
<i>OPTN</i>	Gen que codifica para la proteína optoneurina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGRN	Proteína Progranulina
ProNGF	Factor de crecimiento neuronal o nervioso
RBP	Proteína de unión a RNA
SB	Buffer sodio-ácido bórico
<i>SETX</i>	Gen que codifica para la proteína helicasa probable senataxina
SLPI	Inhibidor de la proteasa leucocítica
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
<i>SOD1</i>	Gen de la Superóxido Dismutasa
<i>TAF15</i>	Gen que codifica para la proteína factor 15 asociada a la caja TATA
<i>TARDBP</i>	Gen que codifica para la Proteína Fijadora de DNA TAR-43
TDP-43	Proteína Fijadora de DNA TAR-43
TMEM106B	Proteína transmembranal sin caracterizar 106B
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TNF	Factor de necrosis tumoral
UPS	Sistema ubiquitina-proteasoma
VCP	Gen que codifica para la proteína que contiene valosina.

II. Resumen.

El desarrollo de nuevas tecnologías para la detección de enfermedades neurológicas complejas, como la demencia frontotemporal (DFT) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), traen como resultado la identificación de un mayor número de individuos diagnosticados con este tipo de enfermedades; además en años pasados se consideraban poco frecuentes y que solo se presentaban en el adulto mayor. Actualmente el envejecimiento de las poblaciones trae como consecuencia que ambas enfermedades sean consideradas un problema de salud pública dado que no solo están presentes en el adulto mayor.

La DFT es la segunda causa de demencia, presentándose la mayoría de los casos en esporádica, ya que sólo aproximadamente 10% de los pacientes cuentan con una historia familiar positiva, con un patrón de herencia autosómico dominante (AD). Los dos principales genes involucrados en los casos familiares de la DFT son: *Granulina (GRN)* y el gen que codifica para la *proteína asociada a microtúbulo (MAPT)*, ambos se asocian entre un 5 a un 20% de los casos familiares. Sin embargo, recientemente se identificó una expansión en el gen *C9orf72* el cual explica alrededor del 21% de los casos familiares.

La ELA afecta a 2 de cada 100,000 personas en el mundo; solo el 5% de todos los casos presentan historia familiar positiva con un patrón de herencia AD el resto son considerados esporádicos. El principal gen involucrado en esta enfermedad es el gen de la superóxido dismutasa 1 (*SOD 1*) que explica alrededor del 20 % de los casos de ELA familiar. Sin embargo, la reciente identificación de un expandido en el gen *C9orf72* explica cerca del 23.5% de los casos de ELA familiar. .

Estudios recientes han demostrado que muchos de los pacientes que presentan un solapamiento de DFT-ELA presentan una expansión repetida del hexanucleótido (GGGGCC) en el primer intrón del gen *C9orf72*.

Con base en estos hallazgos, en este estudio se planteó estudiar los genes *GRN* y *C9orf72* en pacientes con DFT y ELA.

Para llevar a cabo este estudio se colectaron muestras de 70 pacientes con DFT y 50 pacientes con ELA, además de muestras controles de 50 individuos sin ninguna alteración neurológica. Se realizó una toma de muestra de sangre periférica con previa firma del consentimiento informado (Anexo C), de la cual se extrajo DNA genómico. El análisis del gen *GRN* se realizó empleando la técnica de secuenciación automatizada tipo Sanger, mientras que el estudio del gen *C9orf72* se hizo mediante análisis de fragmentos.

En el gen *GRN* se identificaron los siguientes polimorfismos: rs5848, rs17523519, rs850713, rs9897526, rs850713, rs60100877, rs25646 y rs72824736, de estos polimorfismos el rs5848 es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de la DFT, cuando se encuentra de manera homocigota, el polimorfismo rs850713 se asocia a una edad de inicio menor así como una disminuida supervivencia en pacientes con DFT-ELA y como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer; El polimorfismo rs9897526 se encuentra asociado con un retraso en la edad de inicio en los pacientes con DFT; Los polimorfismos rs25646 y rs60100877 son considerados como factor de riesgo para el desarrollo de la ELA. En el gen *GRN* se identificaron 2 variantes patogénicas: 1) La inserción c.88_89insC la cual produce un codón de paro prematuro la variante génica CM084962 previamente reportada se ha asociado al desarrollo de la ELA; 2) la variante génica p.A588T que aún no se reportado sin embargo los estudios *in silico* realizados predicen que es posiblemente dañina.

En el gen *C9orf72* no se identificó a ningún paciente con un repetido mayor a los 23, posiblemente debido a la variabilidad genética en la población mexicana o a una pequeña deleción que recientemente se reportó adyacente al repetido que impide que el método empleado identifique el número real de repetidos en los pacientes.

III. Introducción.

3.1 Concepto de Demencia.

Etimológicamente la palabra demencia deriva del latín de-mentis que puede ser traducido como perder la mente o privado de inteligencia [1]. Durante el periodo Greco-Romano (930 – 210 AD) se realizaron los primeros intentos por clasificar a las demencias identificadas en los ancianos, como un desorden mental [2].

En el siglo XIX la demencia fue descrita como un estado adquirido en el que se muestra un déficit intelectual, que se puede dar a cualquier edad y bajo cualquier circunstancia [1].

Actualmente se dice que la demencia es un término genérico que describe una disfunción crónica o progresiva de la corteza cerebral o subcortical, que lleva al decaimiento intelectual, así como una disminución en la orientación espacial, en la toma de decisiones, en el juicio y en el razonamiento abstracto, lo que conduce a un cambio de humor, de comportamiento, de personalidad del individuo y esto no debe de ser considerado como parte normal del envejecimiento [3].

La demencia afecta del 5 al 20% de la población adulta mayor (mayor a los 65 años) [4]. La incidencia incrementa con la edad, y ésta se duplica cada 5 años, cuando las personas son mayores de 60 años [5].

La Demencia Frontotemporal (DFT) es la segunda causa neurodegenerativa de demencias en pacientes menores a los 65 años, esta enfermedad comprende alrededor del 50% de estos pacientes [6].

3.2 Demencia Frontotemporal.

Éste es un término descriptivo que se usa para referirse a un desorden caracterizado por el deterioro de los lóbulos frontales y temporales del cerebro [9], así como por un deterioro del comportamiento, personalidad y/o lenguaje con una relativa preservación de la memoria [7]. Esta enfermedad presenta diferentes variantes clínicas entre las que se incluye: demencia frontotemporal con cambios

en la personalidad (DFTvc), demencia semántica (DS) y afasia progresiva primaria no fluente (APPNF) [8].

3.2.1 Epidemiología.

Un estudio realizado en población británica encontró que la prevalencia de la DFT en personas menores a los 65 años es de 15 personas por cada 100,000 habitantes [9]; otro estudio realizado en la misma población encontró una incidencia de 3.5 a 4.1 personas por cada 100,000 habitantes al año entre las edades de 45 a 65 años [10]. Esta enfermedad es considerada como una demencia de aparición temprana, encontrándose con una gran incidencia, hasta en 50% de los casos los individuos son menores a los 65 años [9]. Los pacientes tienen una esperanza promedio de vida de 6 años a partir de la aparición de los síntomas [11]. La incidencia entre hombres y mujeres es la misma [12]. Los casos de DFTvc son los más comunes (2/3 de los casos totales) mientras la APPNF y la DS son formas más raras [13]. La DFTvc en un estudio realizado por Roberson E. D., y cols [14] está asociada con una supervivencia más corta y una edad de inicio más temprana mientras que la DS presenta una mayor supervivencia.

3.1.2 Características clínicas.

Los pacientes pueden ser clasificados dentro de 3 diferentes síndromes clínicos dependiendo de la aparición y prevalencia de los siguientes síntomas:

- a) DFTvc:** Los pacientes, que presentan este tipo de variante, muestran un cambio marcado en la personalidad y en su comportamiento, constantemente presentan apatía caracterizada por un olvido de los asuntos personales y sus responsabilidades. Mientras la enfermedad va progresando se observa un desinterés de la persona por su higiene así como una falta de control de los esfínteres. Lo que caracteriza a la desinhibición que presentan estos individuos, es un comportamiento social inadecuado; esto lleva a que el individuo presente un grave deterioro social [15, 16].

- b) DS:** Los pacientes que presentan este tipo de síntomas, muestran una pérdida progresiva de la semántica, esto quiere decir que hay una pérdida de los conceptos acerca de las palabras u objetos. Los pacientes presentan deficiencia en la comprensión de las palabras, como consecuencia el paciente pierda vocabulario. Sin embargo la fluencia y la sintaxis de los pacientes no presenta ningún deterioro. La pérdida de conocimiento parece afectar primero a los ejemplos, por lo que un paciente inicialmente no puede reconocer a un conejo, pero si decir que se trata de un animal [17, 18].
- c) APPNF:** Es un desorden en la expresión del lenguaje, debido a que los individuos que presentan este síntoma pierden la habilidad para hablar con fluidez así como una pérdida variable de la gramática y parafasias fonémicas (substitución de palabras). En las primeras etapas, el paciente habla menos de lo normal y con oraciones más cortas; mientras la enfermedad progresa, los pacientes presentan dificultad para encontrar palabras que expresen lo que piensan, provocando que enmudezcan [19]. Este tipo de variante puede ser sub-dividida en:

APPNF-G. Es una forma predominantemente agramática, con dificultades primarias en la gramática, sintaxis, praxis oral y fluencia [20]. **APPNF-L.** La afasia progresiva logopénica es caracterizada por interrupciones fluctuantes de la fluencia debido a las dificultades que presenta el paciente para encontrar palabras, pero con una sintaxis intacta y sin agramatismo. Esta variante es más rara y está asociada a dificultades en la memoria [21].

No solo se han identificado estas características en los casos de DFT; en 1991 se identificó una familia sueca en donde había casos que presentaban DFT además de características clínicas propias de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [22], posteriormente a esta asociación se le denominó DFT asociada a la enfermedad de la neurona motora (DFT-EMN o DFT-ELA).

3.1.3 Característica neuropatológicas.

Muchos de los casos pueden ser sub-clasificados con base en la presencia o ausencia de inclusiones específicas en: DFT con inclusiones de tau (DFT-TAU), DFT con inclusiones tau negativa pero ubiquitina y TDP-43 positiva (DFT-TDP) y DFT con inclusiones positivas para la proteína de unión a sarcoma (DFT-FUS) [23].

- a) **DFT-TAU:** Las inclusiones tau positivas que se presentan en estos casos son redondas u ovaladas y se localizan en el citoplasma de las neuronas, principalmente en la neocorteza frontal y temporal del cerebro, descritas por primera vez por Alois Alzheimer [24]. Los pacientes que presentan mutaciones en el gen *MAPT* muestran estas inclusiones [25].
- b) **DFT-TDP:** La histopatología de los pacientes con DFT tau negativa, se debe a que presentan inclusiones compuestas por ubiquitina (DFT-U). En el 2006 la investigación en los cerebros que presentaban inclusiones de ubiquitina, llevó a la identificación de la proteína TDP-43 [26], en este estudio también se observó que bajo condiciones patológicas, la proteína es desplazada del núcleo de la célula al citoplasma, donde es hiperfosforilada, ubiquitinada y cortada para producir fragmentos carboxilo terminal [26]. Este tipo de inclusiones se encuentran en casos familiares asociados a mutaciones en el gen *GRN*, *C9orf72* y *VCP* [27], principalmente en el hipocampo y en la corteza frontotemporal [23, 26].
- c) **DFT con inclusiones hechas por fusión del sarcoma:** Del 5 al 20% de los casos de DFT-U, no presentan inclusiones de la proteína TDP-43 si no que se asocian a la proteína fusionada en el sarcoma (FUS) [28, 29]; ésta proteína se encuentra ubiquitinada regulando la expresión génica y la translocación de los cromosomas. Las inclusiones que se presentan son similares en morfología y distribución a las inclusiones de TDP-43 [29].

3.1.4 Etiología y genética de la Demencia Frontotemporal.

Del 40 al 50% de los pacientes con DFT presentan una historia familiar, y del 10 al 50% de estas formas familiares presentan un patrón de herencia autosómico dominante [30].

El estudio genético en los pacientes con DFT familiar ha llevado a la identificación de 6 genes, los cuales se presentan en la tabla 1.

Gen	Localización cromosómica	Proteína que codifica.	% de participación en el desarrollo de la DFT
GRN	17q21.32	Progranulina	5 - 20% en casos familiares
C9orf72	9p21	Aún no identificada	~20% de los casos familiares
MAPT	17q21.1	Proteína tau	5 - 20% de los casos familiares
VCP	9p13.3	Valosina	1% de los casos totales
TARDBP	1p36.2	Proteína fijadora de DNA TAR-43 (TDP-43).	1% de los casos totales
CHMP2B	3p11.2	Proteína multivesicular 2B	1% de los casos totales

Tabla 1. Se presenta el gen, su localización cromosómica, la proteína para la que codifica así como el % de participación en el desarrollo de la DFT [31-37].

3.1.5 El gen de la progranulina (**GRN**).

El gen se localiza en la región cromosómica 17q21.32 (Fig.1), lo conforman 13 exones, de los cuales uno de ellos es no codificante, el splicing alternativo así como la omisión de exones llevan a que se produzcan 3 isoformas [38]. Este gen codifica la proteína Progranulina (PGRN) de 593 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 68.5 KDa (Fig.2) sujeta a proteólisis por la elastasa [39]. La proteína está conformada de 7.5 péptidos de granulina (paragranulina y granulinas A-G) los cuales están compuestos de repeticiones en tándem altamente conservados con un motivo único de 12 cisteínas, excepto granulina G que tiene 10 motivos [40].

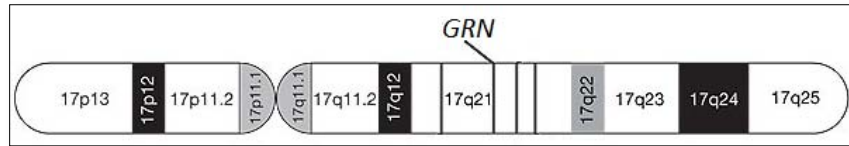


Figura 1. Localización del gen GRN en la región cromosómica 17q21.32. Tomada y modificada de Baker M., et al. [41].

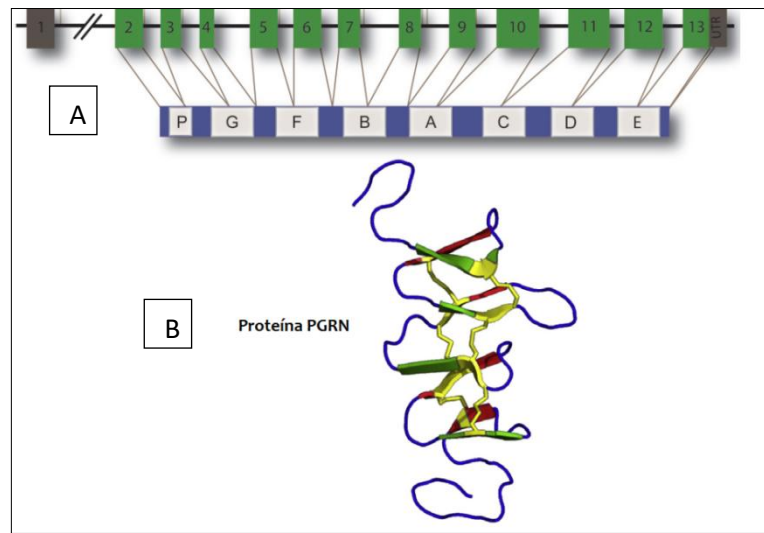


Figura 2. (A) Representación de la organización modular del gen GRN. En la parte inferior se representan los 7.5 péptidos de granulina (Paragranulina (P) y granulinas A-G). (B) Representación esquemática y tridimensional la proteína que codifica el gen GRN (Progranulina); En amarillo se muestran los enlaces disulfuro; En azul los bucles que no tienen estructura; Las flechas que representan las hojas β están marcadas en amarillo y verdes para facilitar su visualización. Tomada y modificada de Nicholson A. M., et al. y Smout M. J, y cols. [42 y 43].

En este gen se han identificado 144 mutaciones patogénicas [44], estas se encuentran distribuidas en toda la región codificante y sitios de splicing. Las mutaciones se encuentran frecuentemente en pacientes que manifiestan la variante clínica DFTvc presentando un patrón de herencia autosómico dominante y muy pocas se encuentran en casos esporádicos excepto en aquellos con una historia familiar incompleta. Las mutaciones en este gen, llevan a una haploinsuficiencia o pérdida de la función de la proteína [41]. Un posible mecanismo por el cual la pérdida de la proteína lleva a la neurodegeneración, es por una inadecuada respuesta al daño neuronal y otro mecanismo relaciona a la proteína con TDP-43, el cual sugiere que la supresión de la proteína PGRN influye sobre el corte patológico de TDP-43 vía caspasa-3, lo que conduce al movimiento de esta proteína del núcleo al citoplasma y subsecuentemente al daño neuronal. [45].

3.1.5.1 Funciones biológicas de PGRN.

En el tejido periférico actúa como un agente anti-inflamatorio, esta es cortada por la elastasa para la obtención de granulinas, las cuales tienen un papel pro-inflamatorio. Este proceso proteolítico es regulado mediante los inhibidores de la secreción de proteasa leucocítica (SLPI) y la apolipoproteína A1, los cuales previenen el corte, ya sea uniéndose a PGRN o antagonizando la función de la elastasa [39].

La expresión de la proteína ocurre en diferentes tejidos, incluido el epitelial, linfocítico, neuronal y cartilaginoso [46]. En el cerebro la expresión de PGRN se observa en etapas tempranas del desarrollo y es baja en edades adultas [47]. La proteína PGRN está involucrada en diferentes procesos biológicos, como la progresión y regulación del ciclo celular, en la inflamación donde se ha encontrado que altos niveles de expresión de la proteína se encuentran asociados a la tumorigénesis. [48], así como mediador en la cicatrización de heridas y reparación del tejido [39]. Se ha identificado como un factor de crecimiento condrogénico, por lo que tiene un papel importante en el desarrollo del cartílago así como en la artritis inflamatoria. [49]. En fibroblastos de embrión murino la interleucina-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) activan la expresión de PGRN [50].

a) Función de PGRN en el Sistema Nervioso Central (SNC).

La proteína se encuentra ampliamente expresada en el sistema nervioso central durante el desarrollo neuronal, y es requerida para la diferenciación sexual del neonato [51]. En el cerebro normal de un sujeto adulto, esta proteína se encuentra expresada en el hipocampo [46]. Se ha observado que en respuesta al daño, la microglía regula de manera positiva la expresión de PGRN [52].

b) Función de PGRN en las neuronas.

En diversos estudios se ha examinado la posible participación de progranulina en el crecimiento neuronal, por ejemplo en un experimento realizado en pez cebra se encontró que esta proteína es importante para que haya un desarrollo

adecuado de las neuronas motoras [53]. Los peces cebra deficientes de los dos homólogos de progranulina, presentan un crecimiento axonal reducido, fenotipo que pudo ser rescatado por una sobre-expresión de progranulina [54]. La expresión de progranulina en periodos tempranos del cerebro es disminuida, por lo que puede ser más relevante en el contexto de plasticidad y re-arreglo neuronal en el cerebro adulto [55].

c) Neuroinflamación.

La expresión de PGRN se ve significativamente incrementada en las enfermedades neurodegenerativas [56]. Varios estudios revelan que esta proteína se encuentra positivamente regulada dentro del SNC debido a la neuroinflamación [52, 57]. La microglía al encontrarse activa durante un largo periodo de tiempo puede causar daño cerebral a través de la generación de citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno, por lo que PGRN puede fungir como un inmuno-modulador al disminuir la activación de la microglía [58].

3.1.5.2 Mutaciones en GRN.

Las mutaciones identificadas en este gen han sido asociadas a daño en el lóbulo frontal temporal e inferior del cerebro, a nivel molecular se encuentran inclusiones principalmente tau negativas y ubiquitina positivas [59]. Todos los portadores de mutaciones patogénicas ya sean asintomáticos o sintomáticos presentan una reducción o haploinsuficiencia en los niveles de PGRN en plasma, suero y líquido céfalo raquídeo [60]; los portadores de mutaciones que cambian el sitio de splicing previenen el tránsito de PGRN, llevando a la degradación de ésta [61], mientras que los portadores mutaciones sin sentido ocasionan haploinsuficiencia, mediante la introducción de un codón de paro, conduciendo al decaimiento del mRNA y una pérdida del 50% de la función de la PGRN [62]. Se ha demostrado que la reducción en los niveles de PGRN, son independientes del estado de la enfermedad por lo que el método de ELISA que es barato y confiable, puede fungir como una herramienta diagnóstica para identificar portadores de mutaciones que no presenten síntomas [63].

Las mutaciones en el gen *GRN* llevan al desarrollo de inclusiones de TDP-43 aunque aún se desconoce la relación entre la disminución en el nivel de progranulina y las inclusiones de TDP-43, dado que en algunos pacientes con DFT TDP-43 se encuentra hiperfosforilada, ubiquitinada y escindida para generar fragmentos C-terminal [45]. Algunos experimentos han demostrado alteraciones en el corte de TDP-43 que realiza la caspasa 3 la cual es mediada por progranulina esto genera 2 fragmentos con un peso molecular aparente de 25 kDa y 35 kDa respectivamente. El fragmento de 25 kDa puede inducir la toxicidad celular, mediante la formación de inclusiones insolubles, hiperfosforiladas y ubiquitina positivas, lo que lleva a su acumulación causando una disfunción celular mediante la interferencia del transporte intracelular, otros encuentran que este proceso es independiente de progranulina, mientras que unos no hayan evidencia de cambio en TDP-43 aún después de realizar experimentos donde se suprime la expresión de progranulina [45]. Mecánicamente TDP-43 es capaz de disminuir los niveles proteicos de progranulina al unirse y desestabilizar su mRNA [64]. Al haber una reducción en los niveles de progranulina, el estrés celular aumenta lo que conduce a un cambio en la localización de TDP-43 al citoplasma, que resulta en la reducción de los niveles de progranulina debido a una interacción entre su mRNA y TDP-43 [65].

El factor de crecimiento neural o nervioso (proNGF), causa la apoptosis neuronal mediante uniones simultáneas a sortilina y al receptor transmembranal p75^{NTR}, las células que carecen de sortilina son inmunes a la apoptosis mediada por proNGF [66]. Dada la afinidad de PGRN hacia sortilina se cree que regula la supervivencia neuronal, mediante esta vía. Sin embargo, se encontró que los sitios de unión de sortilina hacía PGRN son diferentes a los que tiene con proNGF, por lo que hacen falta más estudios para caracterizar esta vía [67]. También se ha encontrado que sortilina media los niveles extracelulares de progranulina. [68]

Diferentes estudios han demostrado que PGRN puede regular directamente la señalización intracelular mediante la unión directa y específica al receptor TNF e inhibiendo el mecanismo mediado por TNF- α , esto conduce a la hipótesis de que

la disminución en los niveles de PGRN junto con cualquier enfermedad llevan a un estado pro-inflamatorio, llevando a la muerte neuronal, pero esta hipótesis deberá corroborarse [67]. En un estudio en ratones se encontró que PGRN atenúa de manera consistente el proceso inflamatorio producido por los niveles altos de expresión de mRNA de TNF- α identificados en los cerebros de los ratones con deficiencia en PGRN [69] también se observó que hay una susceptibilidad al peróxido de hidrógeno en cultivos neuronales murinos con deficiencia en los niveles de progranulina, lo que puede llevar a una muerte neuronal inducida. [69]

3.1.5.3 Factores genéticos que modifican la expresión de GRN.

Uno de los factores genéticos que se encuentra modificando la expresión de la proteína, es la proteína transmembranal sin caracterizar 106B (TMEM106B) que se asocia con la progranulina en los endo-lisosomas. Se han identificado variantes génicas en y cerca del gen, que parecen proteger o retrasar la edad de inicio de los pacientes que presentan mutaciones en el gen *GRN*, a través de elevar los niveles de PGRN, esto puede deberse a que TMEM106B incrementa los niveles intra-celulares de progranulina, presuntamente al secuestrarla durante su secreción y así disminuir la velocidad de su degradación. [70].

También se han visto implicados diversos microRNA (miRNA) en la regulación de PGRN como miR-29b y miR-107 [71, 72]. Así mismo se ha asociado la variante rs5848 que se encuentra localizada en la región 3' UTR, la cual incrementa la unión de miR-659 al gen, causando la disminución de los niveles de expresión, los portadores homocigotos de la variante rs5848, tienen el triple de riesgo de desarrollar DFT en comparación con los que no la presentan [73].

3.2 Esclerosis Lateral Amiotrófica.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se describió, por primera vez en el año de 1869 por Jean-Martin Charcot [74]. Esta enfermedad también es conocida como la enfermedad de Charcot, de Lou Gehrig o de las neuronas motoras. Esta es una enfermedad neurodegenerativa la cual no tiene cura; se caracteriza por la muerte

de las neuronas motoras tanto superiores (NMS) como inferiores (NMI), lo que lleva a una parálisis progresiva y posteriormente a la muerte del paciente por una falla respiratoria, de 3-5 años después de la aparición del primer síntoma [75].

3.2.1 Epidemiología.

Mundialmente la incidencia de esta enfermedad varía de 0.3-2.5 casos por año cada 100,000 personas [76]. Cerca del 90% de los casos son esporádicos, alrededor del 5 al 10% [77] presentan una historia familiar positiva y de éstos el 75% se hereda de manera autosómica dominante [78]. La esperanza de vida de esos pacientes es alrededor de 2 o 3 años posterior a la aparición de los primeros síntomas. [77]. Se ha observado que ligeramente se tienen más casos de hombres que de mujeres, con una relación de 1.5:1 [79]. La edad promedio de inicio de los síntomas en los casos esporádicos varía entre 55 a 65 años [80]. Para los casos familiares, el inicio de los síntomas generalmente se presenta una década antes de los casos esporádicos [81].

3.2.2 Características Clínicas.

Hay muchos sistemas de clasificación para colocar a la ELA. El más simple es distinguirla por su inicio que puede ser: bulbar o espinal. La clasificación más usada es definirla como bulbar o de aparición en extremidad y después categorizarla como una atrofia muscular progresiva, esclerosis lateral primaria o ELA, que así mismo puede ser clasificada por la escala de El Escorial.

La ELA se caracteriza por una combinación de síntomas de las NMS y NMI. Las NMS del sistema nervioso central, se encuentran en la corteza motora o el tronco encefálico, transmitiendo la información motora hacia las NMI. Las NMI's se localizan en el tronco encefálico y médula espinal, transmitiendo los impulsos de las NMS a los músculos en la sinapsis neuromuscular para inervar los músculos esqueléticos que controlan a los brazos y piernas [82].

Los fenotipos clínicos de ELA son los siguientes:

- *ELA clásica* con un inicio en los miembros del cuerpo de manera discreta, con una combinación de NMS y NMI, avanza de manera constante en el tiempo y en el espacio [83] (Alrededor del 70% de los pacientes la presentan [84]).
- *ELA con un inicio bulbar*, los pacientes presentan dificultades para hablar y tragar (25% de los pacientes la presentan) [85].
- *Esclerosis lateral primaria* es el nombre que se le designa al síndrome donde solo se involucran las NMS [86], se caracteriza por espasticidad y debilidad muscular. En más de la mitad de los pacientes los síntomas empiezan incidentalmente en las piernas, para ascender, lentamente y relativamente de manera simétrica a los brazos [83].
- *Atrofia muscular progresiva* describe un fenotipo donde solo se involucran las NMI, caracterizada por fasciculaciones y debilidad muscular [83]. Los síntomas pueden empezar en cualquier parte del cuerpo y comparada con otros fenotipos los hombres tienen una edad de inicio mayor [87].

Esta enfermedad es progresiva, alrededor del 50% de los pacientes mueren dentro de los 30 meses a partir de la aparición de los síntomas, solo un 20% de estos viven entre 5 y 10 años después de la aparición de los síntomas [88].

Se han identificado en los últimos años pacientes con ELA que pueden llegar a desarrollar DFT, esto se puede deber a que los déficits cognoscitivos en un principio, pueden ser muy tenues, por lo que pasan desapercibidos de un 20 a un 50% en los pacientes con ELA que cumplen con el perfil de DFT [89]. Y al mismo tiempo alrededor del 15% de los pacientes que presentan DFT desarrollan síntomas relacionados con la degeneración de las neuronas motoras [90].

3.2.3 Características neuropatológicas.

Los agregados de proteínas o inclusiones han sido ampliamente reconocidos como un marcador patológico de muchas enfermedades neurodegenerativas. En la ELA estas inclusiones se acumulan de manera anormal en el citoplasma de las neuronas motoras espinales; caracterizadas por ser del tipo ubiquitina y TDP-43 positivo [91]. Estudios neuroinmunopatológicos de TDP-43 incluyen a la mayoría de los casos esporádicos y familiares de ELA dentro de un espectro de enfermedades que incluyen no solamente a los casos con ELA, o DFT sino también a los casos con DFT-ELA [92]. Bajo condiciones patológicas TDP-43 forma inclusiones que se encuentran ubiquitinizadas e hiperfosforiladas [93]. También se han identificado inclusiones de la proteína SOD1, así como de la proteína FUS sin embargo las inclusiones de TDP-43 son los componentes proteínicos más observados; se presentan en el 97% de los pacientes con ELA y cerca del 45% de los pacientes con DFT. En la siguiente figura se esquematizan las principales proteínas que conforman las inclusiones identificadas en los pacientes con ELA y DFT [37].

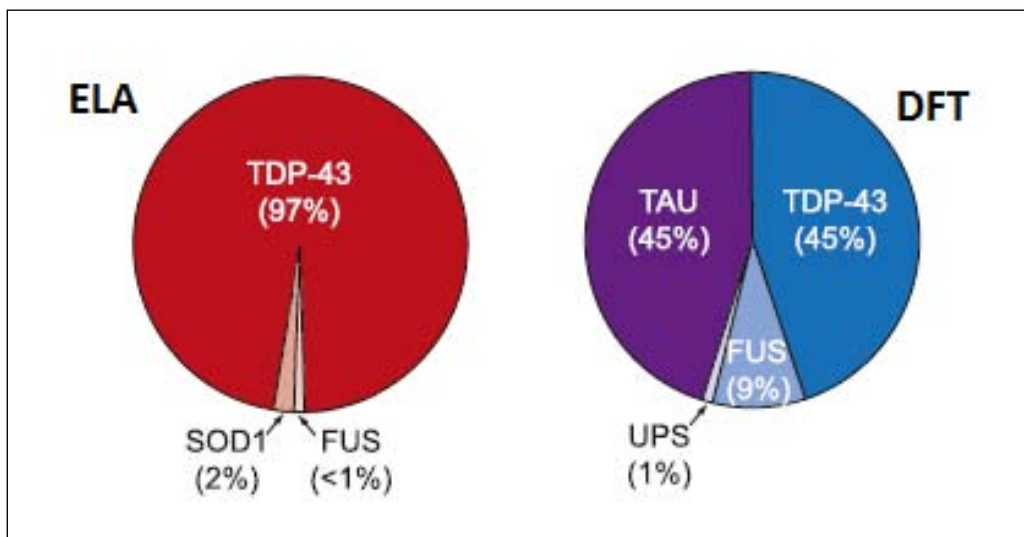


Figura 3. Inclusiones patológicas de proteínas en casos con ELA y DFT, de acuerdo a la proteína que más se acumula. Las inclusiones de TDP-43 y FUS reflejan el solapamiento entre estas dos enfermedades. Las siglas UPS son el sistema ubiquitina-proteasoma. Tomado y modificado de Ling SC y cols. [37]

3.2.4 Etiología y genética de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

La identificación de genes asociados a la ELA ha sido difícil debido a dos factores:

- La enfermedad se presenta en la edad adulta, por lo que pedigríes grandes para estudios de linaje son inusuales [94].
- El hecho de que algunos casos se ha observado que la ELA y la DFT, enfermedades con manifestaciones clínicas diferentes presentan el mismo proceso patológico. [94]

El estudio genético en los pacientes ha llevado a la identificación de diferentes genes que al estar mutados, llevan al desarrollo de la ELA. Estos genes se presentan en la siguiente tabla:

Gen	Localización cromosómica	Proteína que codifica.	% de participación en el desarrollo de la ELA
C9orf72	9p21	Aún no identificada	~37% de los casos familiares
SOD1	21q22	Superóxido Dismutasa	~20% de los casos familiares
TARDBP	1p36.22	Proteína fijadora de DNA TAR-43	4% de los casos familiares
FUS	16p11.2	Proteína fusionada en sarcoma	4% de los casos totales
UBQLN2	Xp11.21	Proteína fijadora de DNA TAR-43 (TDP-43).	1% de los casos totales
TAF15	3p11.2	Factor 15 asociado a la caja TATA	1% de los casos totales
ANG	14q11.1-q11.2	Angiogenina	>1% de los casos totales
SETX	9q34.13	Helicasa probable senataxina	>1% de los casos totales
ATXN2	12q24.1	Ataxina 2	
VCP	9p13.3	Valosina	1-2% de los casos familiares

Tabla 2. Se presenta el gen, su localización cromosómica, la proteína para la que codifica así como el % de participación en el desarrollo de la DFT [95-97].

En la figura 4 se muestran algunos genes que fueron mencionados los cuales están involucrados como se mencionó en el desarrollo de la ELA, DFT y ELA-DFT.

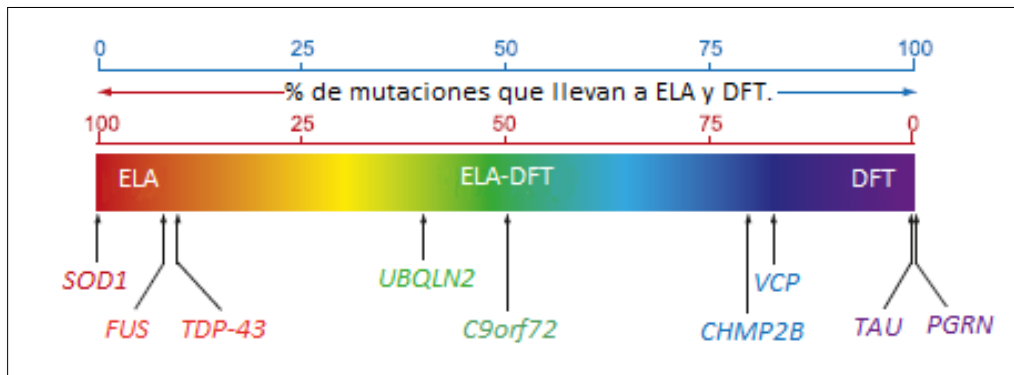


Figura 4. Es la figura se observan los genes que más contribuyen al desarrollo de ELA y DFT (ELA en rojo y DFT en morado), los cuales están acomodados de acuerdo a la tasa de mutaciones patogénicas conocidas que dan origen a ELA y DFT. Tomado y modificado de Ling SC y cols. [37]

3.2.5 El gen *C9ORF72*.

En el año 1991 en Suecia se identificó una familia en donde todos los individuos presentaban no solo ELA o DFT, sino también el traslape entre ambas enfermedades conocido como ELA-DFT, siendo esta familia la primera sugerencia de la relación genética entre estas ELA y DFT [98]. En el año 2006 los estudios de ligación en la familia sueca y otras familias llevaron a la identificación de un locus en la región cromosómica 9p.21.2; hallazgo que se confirmó no solo después de estudiar varias familias, sino también de realizar estudios de asociación de genomas [99]. El análisis de la región 9p.21.2 (Figura 5) en el año 2011 llevó en pacientes con DFT- ELA a la identificación de una secuencia expandida de un hexanucleótido repetido (GGGGCC) en el gen *C9orf72* de hasta 700 repeticiones. En población normal el expandido está compuesto de 3 a 23 repeticiones [100, 101], esta expansión se encuentra entre los dos primeros exones (1a y 1b) no codificantes. Este gen se compone de 11 exones, que a través de splicing alternativo produce tres variantes de transcritos que al ser traducidos forman dos isoformas alternativas, las cuales aún no se caracterizan [101].

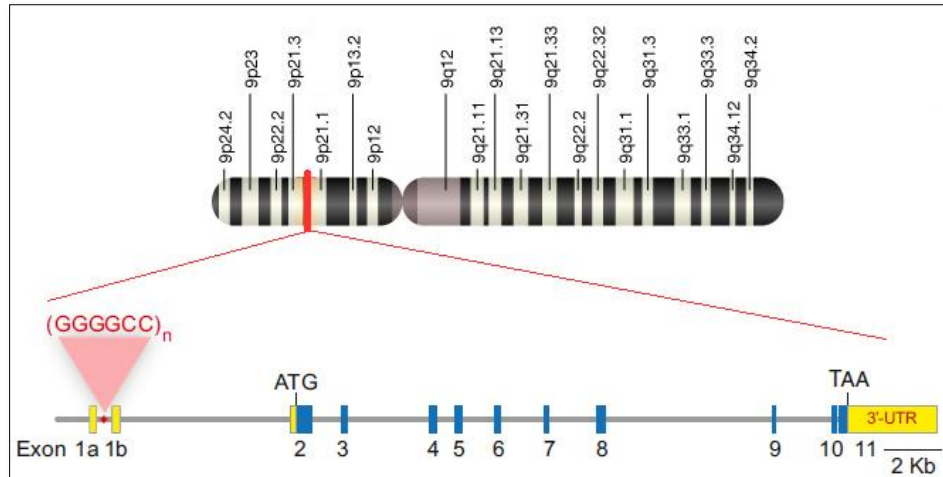


Figura 5. Localización del gen *C9orf72* en la región cromosómica 9q21.22 y del expandido “GGGGCC” entre el Exón 1a y 1b. Tomada y modificada de Baker M., et al. Y “UCSF Memory and aging center” [31, 73].

Las variantes 1 y 3 de los transcritos se predice que codifican para una proteína de 481 aminoácidos a partir de los exones 2-11, mientras que la variante 2 del transcrito codifica para una proteína de 222 aminoácidos a partir del exón 2 al 5 (Fig. 6) [100, 101].

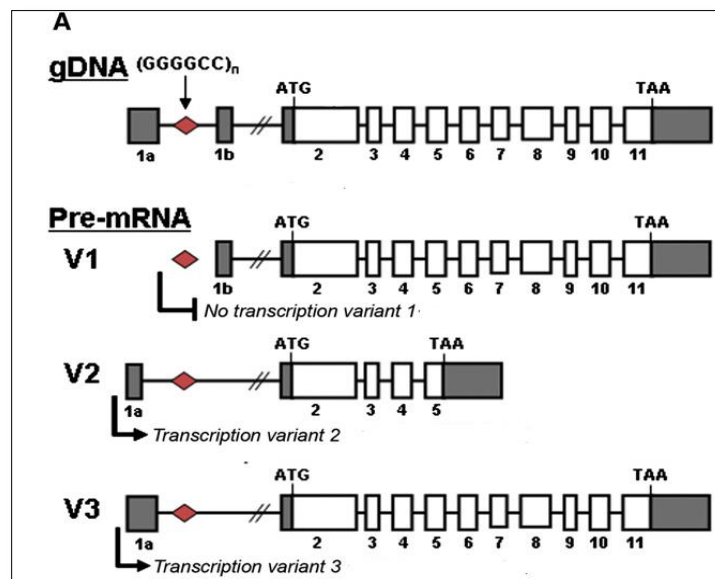


Figura 6. Visión general de la estructura genómica del locus *C9ORF72* (Panel superior), y los transcritos producidos por splicing alternativo (Panel inferior). Los paneles blancos muestran la región codificante mientras que los grises, la región no codificante. Tomada y modificada de DeJesus-Hernandez M y cols. [101].

Mediante el uso de microarreglos, se ha podido detectar al RNA de este gen en diferentes tejidos del sistema nervioso central; los niveles de expresión más altos se observaron en el cerebelo [100].

Aún se desconoce el papel que funge la proteína C9orf72, sin embargo hay evidencia que demuestra que se encuentra estructuralmente relacionada a los dominios de proteína DENN (Por sus siglas en inglés: Differentially Expressed in Normal and Neoplastic cells), las cuales son proteínas que intercambian GDP-GTP para Rab GTPasas [102].

3.2.5.1 Fenotipo clínico asociado a C9orf72.

La información clínica de los pacientes con la expansión del hexanucleótido repetido ha demostrado que cerca del 55.8% de los que poseen la expansión del repetido son hombres [103]. Es importante mencionar que tanto la edad de inicio como la duración de la enfermedad son muy variables aún dentro de una misma familia [103]. En términos de lo reportado se tiene que la edad de inicio varía entre los 27 a los 83 años mientras que la duración de la enfermedad va de 3 a 264 meses [104]. Aproximadamente el 29.3% de los pacientes con la expansión del repetido muestran un espectro de DFT-ELA [103]; 44.2% de los pacientes con ELA que tienen la expansión del repetido presenta un inicio bulbar [105], mientras que alrededor del 81% de los pacientes con DFT que presentan la expansión del repetido presentan la variante clínica DFTvc [106]. Se ha observado que muchos de los pacientes que presentan la expansión del repetido inician con deterioro cognoscitivo o síntomas de psicosis, en comparación con pacientes que presentan mutación en otro gen o en un gen desconocido [107].

3.2.5.2 Frecuencia de la mutación.

La frecuencia de esta mutación entre la población es muy heterogénea, siendo mayor en poblaciones aisladas de Finlandia y Cerdeña, así como en cohortes donde los pacientes presentaban un diagnóstico patológico de DFT-TDP [104].

La frecuencia de la expansión del repetido en población Norte Americana y Europea es del 37% en casos familiares de ELA, 6% de casos de ELA esporádico; por el otro lado en 21% de los casos con DFT familiar y en el 6% de los casos esporádicos con DFT [104]. En un estudio realizado en casos familiares de ELA-DFT se encontró que en Estados Unidos la expansión del repetido se encuentra en el 36.2% de los casos, mientras que en Europa se encuentra predominantemente en población finlandesa (46.4%) [100]; en esta población se identificó un efecto de fundador para la expansión de este repetido [104, 108]. De los casos esporádicos en Europa 7.8% presenta la expansión del repetido siendo más prevalente la población finlandesa, mientras que en Estados Unidos el 5.5% de los casos esporádicos presentan la expansión del repetido [104].

3.2.5.3 Neuropatología.

Los pacientes con la expansión del repetido en el gen *C9orf72* tienen características patológicas únicas. Los agregados fosforilados de TDP-43 se encuentran acompañados de otras inclusiones que son negativas para TDP-43 fosforilada, las cuales se encuentran en el citoplasma particularmente en las células del cerebelo, hipocampo y neocorteza frontotemporal, las cuales solo se pueden identificar con anticuerpos para la proteína 62 (p62) o para ubiquitina [109]. Las inclusiones de TDP-43 y de p62 son características de los pacientes que portan la mutación en el gen *C9orf72* y no se encuentran en otro tipo de pacientes que presenten un cuadro clínico similar sin expansión del repetido [110].

3.2.5.4 Mecanismo Patogénico.

Hasta el momento se han descrito 3 posibles mecanismos los cuales se esquematizan en la figura 7 y se explican a continuación:

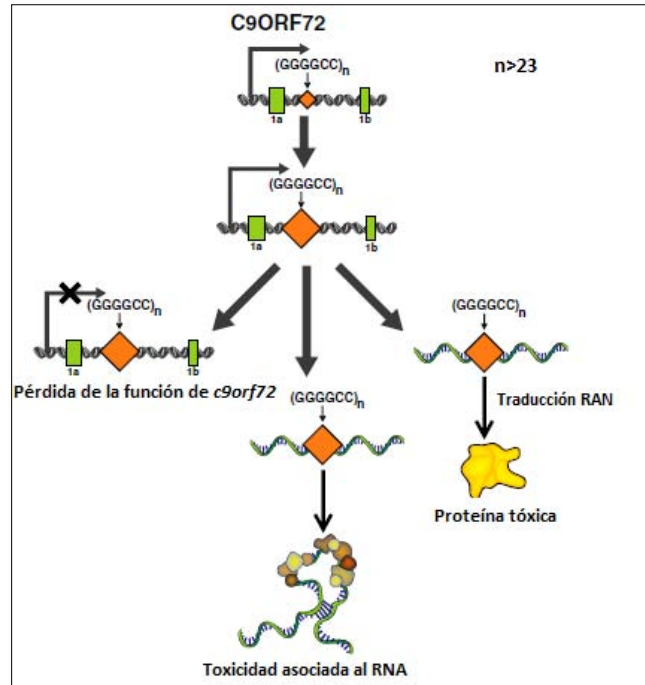


Figura 7. Se muestran los 3 mecanismos, por los que el expandido "GGGGCC" lleva al desarrollo de la DFT-ELA. Se muestra el mecanismo que involucra la pérdida de la función del gen *C9orf72*. Mientras los otros dos mecanismos involucran una ganancia de función. Tomado y modificado de Orr H. T. y cols [111].

a) Haploinsuficiencia o pérdida de la función.

Esta hipótesis tiene apoyo por investigaciones en pez cebra y en *Caenorhabditis elegans*. En el modelo Knock-down del pez cebra del homólogo altamente conservado *zC9orf72* se ha observado un cambio en el comportamiento y déficits neuronales caracterizado por una degeneración axonal y una motilidad reducida [112]. En *C. elegans* la delección del gen *F18A1.6* también conocido como alfa-1 (Ortólogo del gen *C9orf72*), resultó en una degeneración de las neuronas motoras así como en una mayor sensibilidad al estrés que lleva a una mayor degeneración de las neuronas motoras [113]. Niveles reducidos del transcrito de *C9orf72* principalmente de la variante 1, se han identificado en diferentes regiones del cerebro de los portadores de la expansión del repetido [114]. Adicionalmente se han encontrado niveles reducidos de la proteína C9orf72 en la corteza frontal, pero no en el cerebelo de los portadores de la expansión [101]. Los niveles

disminuidos de los transcritos de *C9orf72* pueden ser explicados por dificultades en la transcripción y procesamiento del RNA debida a la expansión de “GGGGCC” o por una hipermetilación de las islas CpG cercana a la expansión del repetido lo que lleva a un silenciamiento del DNA mutado; se ha observado que los pacientes que presentan ELA y un expandido en el gen *C9orf72* además de tener un alelo hipermetilado con más de 50 repetidos tienen una expresión reducida del transcrito *C9orf72* [115]. La reducción de los niveles de la transcripción también pueden explicarse por la tri-metilación de residuos de lisina de las histonas H3 y H4 (H3K9, H3K27, H3K79 y H4K20) [116]. No se sabe exactamente cómo es que la reducción en los niveles de ésta proteína se encuentra involucrada con el desarrollo de la enfermedad pero se ha sugerido la posibilidad de que haya una desregularización del tráfico vesicular necesario para un proceso autofágico eficiente, dependiente de las proteínas Rab, dada su relación estructural con los dominios de proteína DENN. [117].

b) **Toxicidad asociada al RNA del repetido**

La secuencia de ambas hebras de RNA del gen *C9orf72* que poseen la expansión del repetido, pueden llevar a la formación de bucles u horquillas estables, heterodúplex DNA-RNA así como dúplex de RNA, cuádruplex-G o estructuras denominadas i-motifs [118]. La complejidad de las estructuras secundarias puede ser la causa de la agregación del expandido repetido de RNA llevando a la formación de inclusiones de RNA en la corteza frontal y en espina dorsal aunque también se han encontrado en la corteza motora, lóbulo temporal, cerebelo e hipocampo, principalmente en las neuronas, además de en los astrocitos, oligodendrocitos y microglía [119, 120]. El incremento de la longitud de los repetidos lleva a la formación de uni- y multi- cuádruplex-G pero aún no es claro si es posible la formación de estos cuádruplex-G *in vivo* debido a la falta de técnicas de visualización *in vivo* [121]. En los cuádruplex-G las cuatro guaninas interactúan a través del enlace conocido como Hoogsteen alrededor de un catión monovalente, lo que lleva a la formación de cuartetos-G

[122] (Figura 8). También los residuos de guanina pueden interactuar con guaninas de la misma hebra y formar cuádruplex-G unimoleculares (Figura 9-A) o con guaninas de otras hebras lo que lleva a que se formen cuádruplex-G multimoleculares (Figura 9-B) [122]. Aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual este tipo de estructuras afectan el splicing del gen *C9orf72* así como la formación de mRNA [121].

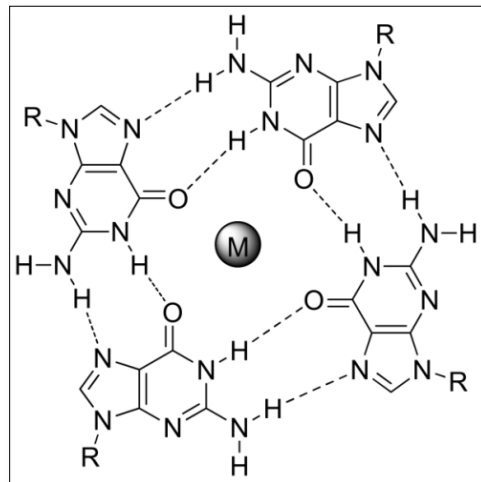


Figura 8. Estructura del cuádruplex-G estabilizado por enlaces tipo Hogsteen y un catión monovalente en el centro. Tomada y modificada de Ma DK. y cols [123].

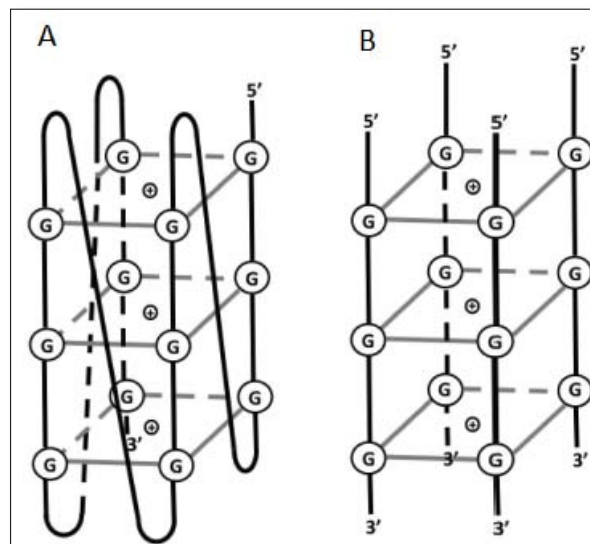


Figura 9. A. Cuádruplex-G unimolecular. B. cuádruplex-G multimolecular. Tomada y modificada de Reddy K. y cols [121].

Los cuádruplex-G se han vinculado a funciones biológicas tales como la inestabilidad genética y la regulación telomérica [121]. Las formas expandidas del repetido son probablemente más estables dado que se ha identificado *in vivo* en forma de inclusiones de RNA [101,124]. Aún se desconoce el mecanismo por el cual se forman estas inclusiones de RNA; pero uno de los posibles mecanismos es una inefectiva degradación de los transcritos por la maquinaria celular.

b.1) La toxicidad del RNA.

Esta toxicidad involucra la acumulación de especies de RNA, que generalmente se encuentran en el núcleo, las cuales se tiene la hipótesis de que perturban la función y secuestran a las “proteínas de unión a RNA” (Por sus siglas en inglés RBP’s) apoyando la hipótesis de la toxicidad mediada por RNA [124]. Este mecanismo ya se ha propuesto en otras enfermedades debidas a expandidos de repetidos como: la enfermedad de Huntington [125], Distrofia miotónica tipo 1 y 2 [126], así como en diferentes ataxias espinocerebelosas [127].

Se han identificado proteínas que se unen a varias estructuras G4C2 y C4G2 así como los cuádruplex G. Dentro de los grupos de proteínas involucradas, el grupo más grande que se identificó es el grupo de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas que por sus siglas en inglés son: “hnRNPs” [119].

Dentro del grupo de las hnRNPs se encuentra hnRNP A3, la cual se identificó como un componente patológico en inclusiones TDP-43 negativo/p62 positivo, dentro del citoplasma neuronal del hipocampo de pacientes con el expandido repetido [128, 129]. Dada la relación entre hnRNP A3 con la exportación del mRNA del gen *C9orf72* que posee la expansión, ha llevado a la especulación de que la unión entre hnRNP A3 y el pre-mRNA del expandido conducen a su exportación al citoplasma y por lo tanto a que se traduzca por un mecanismo conocido como traducción RAN [118]. Esto es consistente con el hecho de que no se encuentra hnRNP A3 co-localizando con las inclusiones nucleares en

tejidos de cerebelo. Interacciones entre FUS [129, 130] y el expandido son importantes dado que en un reciente descubrimiento la proteína FUS se une a la parte telomérica de los cuádruplex G y puede estar involucrado en la regulación de la longitud del telómero [131, 132].

Además de los miembros de la familia hnRNP, se han encontrado otras proteínas que se unen al RNA G4C2 como: 1) proteína activadora Pur- α la cual al unirse con el RNA del expandido causa la pérdida de la función de esta proteína y se ha visto que la inhibición de esta proteína en línea celular N2A reduce su viabilidad [133]; 2) Por otro lado la proteína activadora de adenosina que actúa en RNA B2 (ADARB2), se involucra en la formación o mantenimiento de las inclusiones de RNA, al unirse al RNA y disminuir sus niveles, esto produce un aumento en la susceptibilidad debida a toxicidad por glutamato [134]; 3) Y por último la nucleolina que es una proteína nucleolar que se une específicamente a los cuádruplex G del repetido y co-localiza en las células de los pacientes que portan el expandido del repetido [135].

Se ha identificado también estrés nucleolar como un posible factor adicional al procesamiento anormal del RNA. En los pacientes que presenta el repetido expandido, se ha encontrado a la nucleolina y nucleofosmina, como las proteínas nucleolares más abundantes y se localizan en el nucléolo. La nucleolina también interactúa con el RNA de G4C2 y co-localiza con las inclusiones de RNA en los portadores de la expansión [136].

c) Traducción RAN.

Este tipo de traducción no inicia con el codón "AUG", es una forma de traducción que toma lugar en las regiones repetidas formando bucles estables [137]. La traducción ocurre a través de tres marcos abiertos de lectura tanto de la hebra sentido como la antisentido, lo que resulta en un péptido largo que se encuentra constituido de un solo o varios aminoácidos [138]. Son pocas las neuronas que contienen inclusiones de la hebra antisentido, pero había un mayor número de inclusiones de RNA antisentido por neurona [120]. El

mecanismo por el cual esta traducción sucede es desconocido, sin embargo se han descrito algunos lineamientos para este modelo; 1) La traducción RAN parece que depende de la longitud del repetido, a diferentes longitudes se va a producir una proteína con un aminoácido repetido diferente; 2) La traducción requiere de estructuras secundarias en forma de horquillas para que se lleve a cabo el proceso; 3) Finalmente una vez que la traducción inició el proceso no sufre cambios en el marco de lectura o se interrumpe [139]. Este tipo de traducción no solo se ha asociado a ELA y DFT sino también a otras enfermedades debidas a la expansión de repetidos, como con la Ataxia espinocerebelosa tipo 8 [139].

La transcripción del expandido repetido G4C2 de los tres marcos abiertos de lectura da como resultado a proteínas de dipéptidos repetidos de poli-glicina-alanina (poly(GA)), poli-glicina-prolina (poly (GP)) y poli-glicina-arginina (poly(GR)), mientras que la transcripción reversa resulta en: poli-prolina-arginina (poly(PR)), poli-glicina-prolina (poly(GP)) y poli-prolina alanina (poly(PA)). Se han hecho estudios de inmunohistoquímica en cerebro para determinar la existencia de estas proteínas, las cuales se identificaron predominantemente en el cerebelo y el hipocampo co-localizando con agregados de la proteína p62 [140]. En la tabla 2 se muestra la relativa neuropatología de las proteínas que se traducen del expandido.

	Poly(GA)	Poly(GP)	Poly(GR)	Poly(PR)	Poly(PA)
Corteza	+++	+++	+++	±	±
Hipocampo	+++	+++	+++	±	±
Cerebelo	+++	+++	+++	±	±
Espina dorsal	±	±	±	-	-
Amígdala	ND	+++	ND	±	±
Tálamo	ND	+++	ND	±	±
Médula	+	++	ND	±	±
Sustancia nigra	±	+	ND	ND	ND

Tabla 3. Localización y la neuropatología relativa de los tipos de proteínas que se obtienen de la traducción RAN del hexanucleótido. ND: No determinado. Tomado y modificado de Gendro T. F. y cols [141].

Aún se desconoce si la formación de este tipo de proteínas son benignas o juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo el grupo de trabajo de Ranum evidenció que las proteínas poliGR y poliGP inducen toxicidad de una manera independiente a la acumulación del RNA del repetido [140]. En otro estudio se encontró que poliGA ejerce su efecto tóxico mediante el secuestro de la proteína Unc119, la cual funciona como un factor de tráfico para proteínas miristoiladas [142].

En la figura 10 se resumen algunos de los mecanismos por los cuales el RNA lleva a cabo su función tóxica.

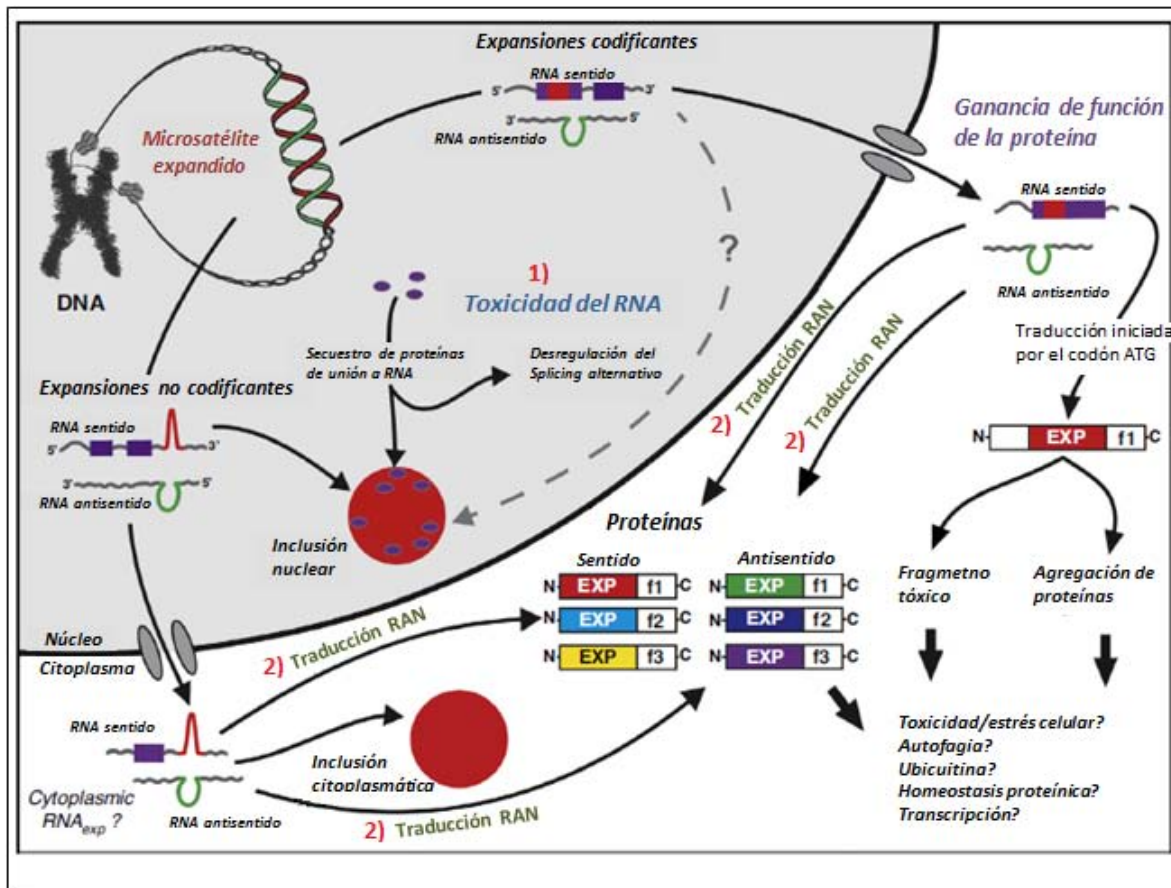


Figura 10. Se muestran algunos de los mecanismos por los cuales el RNA del repetido expandido realiza su función tóxica. 1) Toxicidad del RNA: Creando inclusiones o secuestrando proteínas de unión a RNA. 2) Traducción tipo RAN: Se producen proteínas que pueden llegar a ser tóxicas para la célula. Tomada de Cleary J. D. y cols [143].

IV. Planteamiento del problema.

Las enfermedades neurodegenerativas son devastadoras para el paciente y sus familiares. El mecanismo por el cual estas enfermedades se desarrollan aún no ha sido completamente dilucidado, pese a que se han identificado factores genéticos y ambientales.

Debido al traslape de síntomas que se ha identificado entre la DFT y la ELA, el diagnóstico basado solamente en las características clínicas es difícil, por lo que se requiere de un abordaje de análisis molecular de los genes descritos para estas enfermedades para así poderle brindar al paciente un diagnóstico de certeza que permita un mejor abordaje clínico del paciente y que este pueda repercutir no solo en su adecuado tratamiento sino también en su manejo.

La importancia de realizar el estudio molecular en los pacientes con ELA y DFT es que se puedan conocer más información sobre los genes *GRN* y *C9orf72* en población mexicana; el estudio de la expansión del repetido en el gen *C9orf72* nos permitirá conocer el número de repetidos que se pueden encontrar en población tanto de personas sanas como en pacientes; mientras que el estudio en el gen *GRN* nos ayudará a identificar no solo variantes descritas sino también variantes nuevas que puedan fungir como predictores de riesgo. Con toda la información que se genere en este estudio se podría establecer un análisis molecular que podría identificar a los pacientes con estas enfermedades pre-sintomáticamente, lo que permitiría poder definir posibles riesgos para su familia y su descendencia.

V. Hipótesis.

El 25% por ciento de los pacientes con DFT y ELA presentarán una expansión del hexanucleótido GGGGCC en el gen *C9ORF72*, mientras que 20% de los pacientes con DFT presentarán mutaciones en el gen *GRN*.

VI. Objetivo general.

Identificar variables génicas en pacientes con ELA y DFT en los genes *C9orf72*, además de buscar variantes génicas en el gen *GRN* en pacientes con DFT.

6.1 Objetivos particulares.

- Determinar el número de repetidos de la expansión del hexanucleótido en el gen *C9orf72* en pacientes que presenten DFT o ELA, con o sin antecedentes familiares así como en controles.
 - Comparar el número de repetidos identificados entre pacientes y controles
- Identificar mutaciones o polimorfismos en los 12 exones del gen *GRN* en pacientes mexicanos con demencia Frontotemporal.

VII. Diseño experimental.

En la figura 9 se muestra un diagrama de la metodología que se siguió para la realización de este estudio

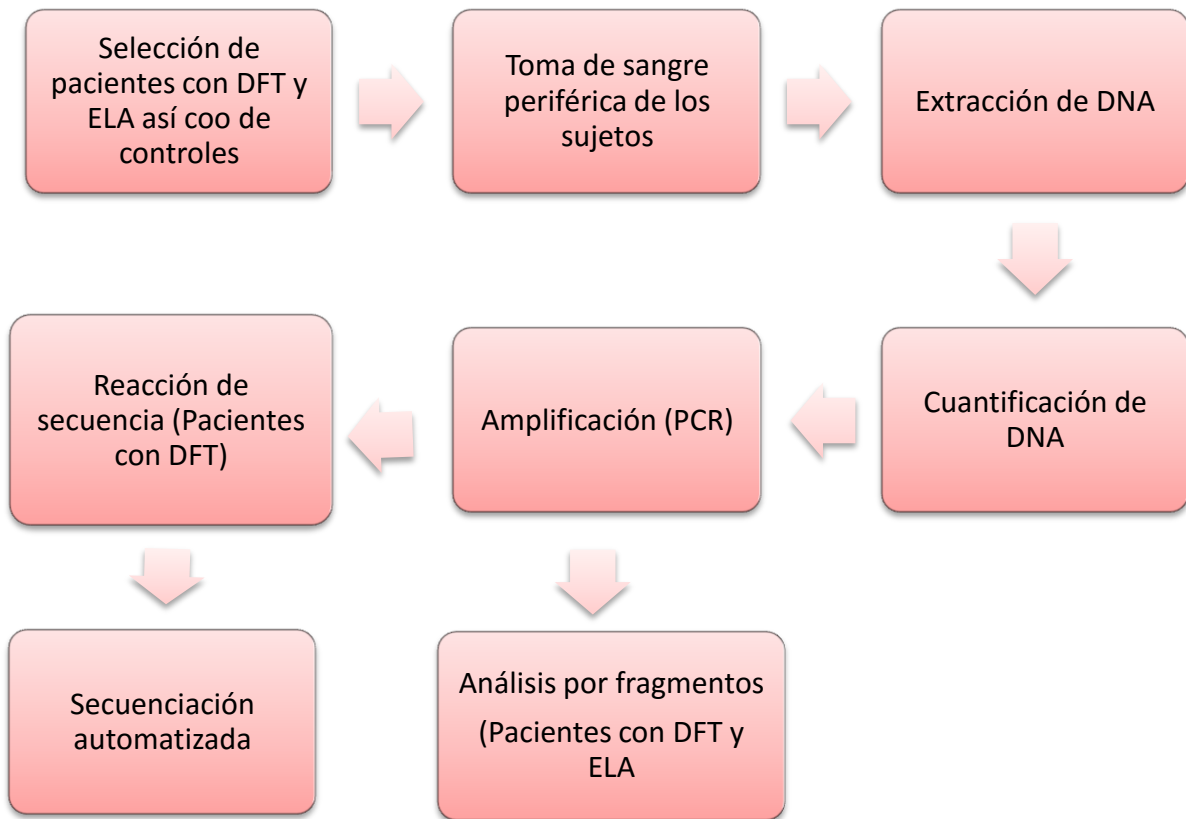


Figura 11. Metodología general empleada en el estudio.

Población de estudio.

El grupo de población constó de 70 pacientes de ambos sexos con probable diagnóstico de Demencia Frontotemporal (Fig.12) con una edad de inicio promedio de 57.9 años y un rango de edad de los 32 a 99 años, de estos pacientes 40.99% son esporádicos y el 59.01% son familiares. Un grupo de 50 pacientes de ambos sexos con diagnóstico de Esclerosis Lateral Amiotrófica (Fig. 13), los cuales fueron atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS); de estos 10% son casos familiares mientras que el 90% son casos esporádicos. Además un grupo control que constó de 50 individuos sanos con un promedio de edad de 72.3 años y un rango de 62 a 93 años, no relacionados entre sí y sin datos o antecedentes neurológicos (Fig. 14). El grupo control se obtuvo del banco de DNA con el que cuenta el laboratorio.

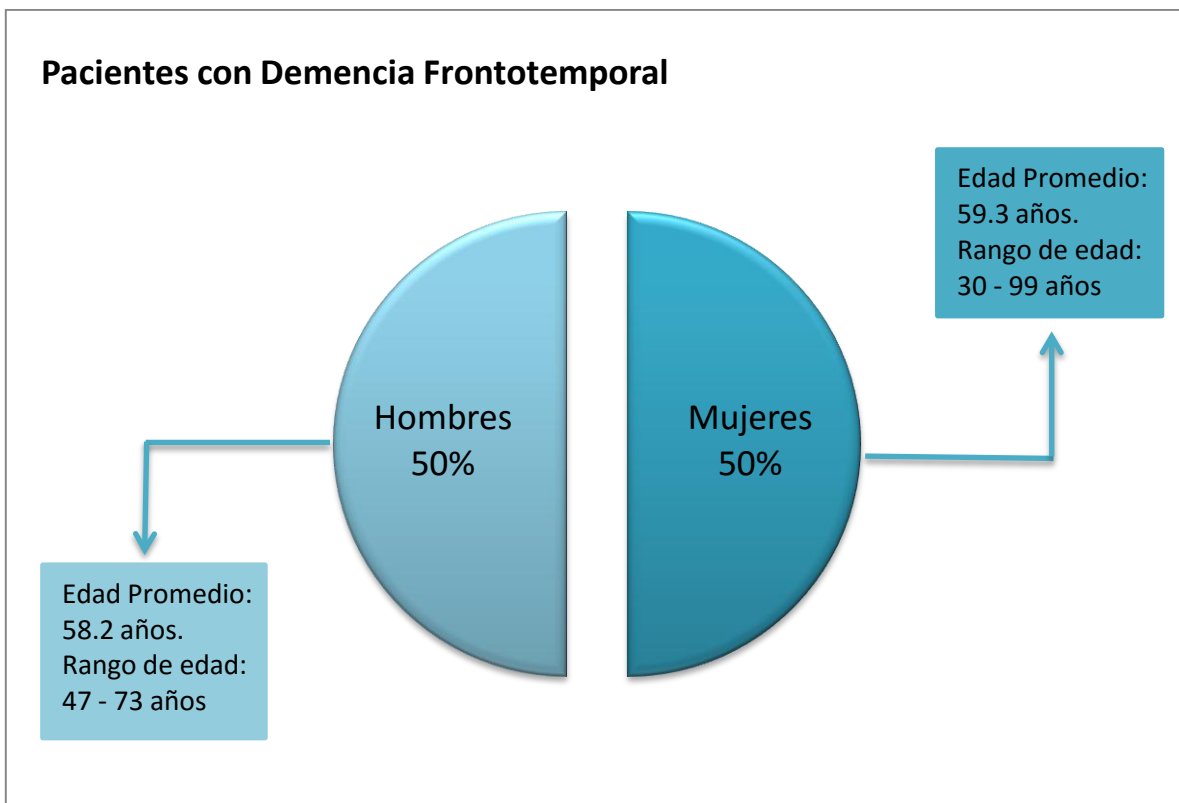


Figura 12. Porcentaje de hombres y mujeres que pertenecen a la población de pacientes con Demencia Frontotemporal.

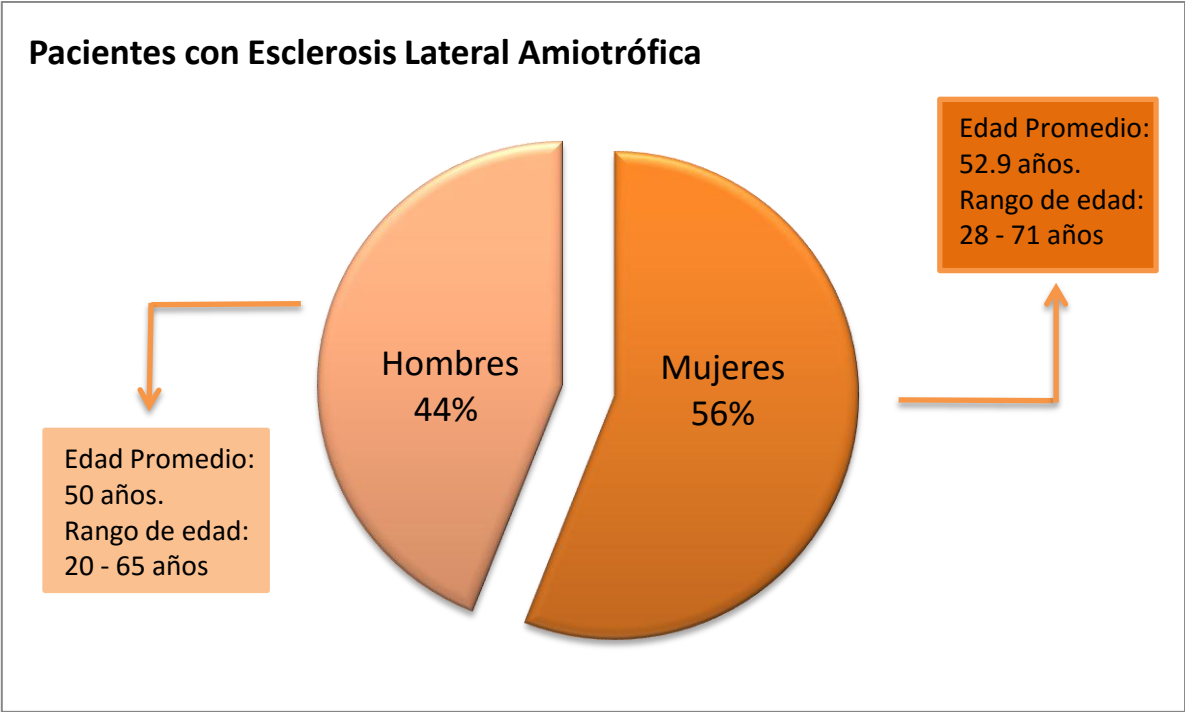


Figura 13. Porcentaje de hombres y mujeres que pertenecen al grupo de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica.

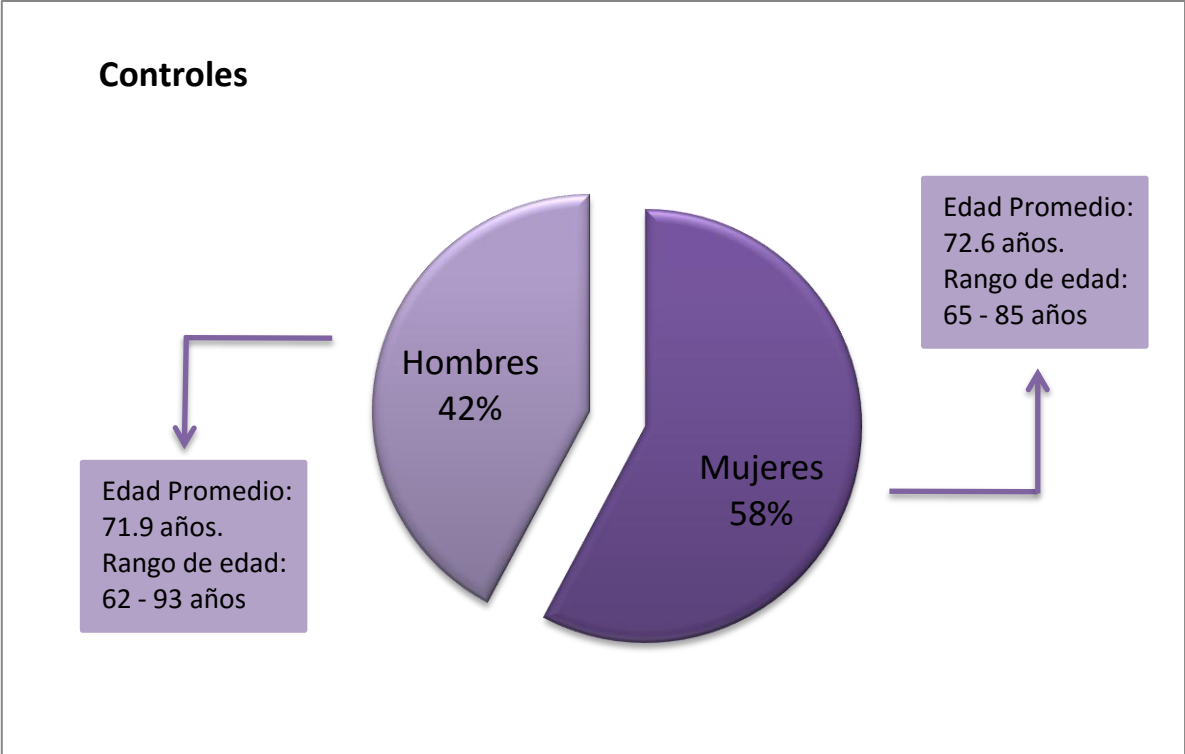


Figura 14. Porcentaje de hombres y mujeres que cuales pertenecen al grupo control.

Diagnóstico de los pacientes.

El diagnóstico de los pacientes con DFT se realizó empleando el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales IV (en inglés DMS-IV).

El diagnóstico de los pacientes con ELA se realizó mediante el empleo de los criterios de “El Escorial”.

Criterios de inclusión.

Individuos con diagnóstico de probable DFT y ELA que aceptaran participar en el estudio, que firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión.

Individuos que no cumplan criterios clínicos de diagnóstico de DFT o ELA; o que no hayan aceptado participar en el estudio.

Tipo de estudio.

Este estudio es explicativo descriptivo, retrospectivo y transversal.

Alcance.

Se pretende corroborar que los principales genes asociados a la DFT y ELA en otras poblaciones también se relacionen en nuestra población. Y de esta manera poder establecer un mejor diagnóstico molecular.

Toma de muestra.

Se colectó una muestra de 6 mL de sangre periférica la cual se obtuvo mediante una venopunción, la cual se obtuvo utilizando tubos Vacutainer™ con citrato de sodio como anticoagulante, con una capacidad de 6mL. Las muestras fueron preservadas a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

Extracción de DNA

El DNA genómico se obtuvo de la muestra de sangre a través de la metodología de Sales Miller [144]. (Modificada por el laboratorio). Esta metodología se presenta a detalle en la sección “A” del apéndice.

Cuantificación y análisis de integridad del DNA.

La determinación de la concentración de DNA, se realizó mediante espectrofotometría (Instrumento NanoDrop 2000) a una longitud de onda de 260 nm. Además se determinó la relación A_{260}/A_{280} para conocer la relación de pureza de las muestras de DNA.

Este análisis de integridad se realizó mediante electroforesis, empleando un gel de agarosa al 1%. La metodología se detalla en la sección “A” del apéndice.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

La amplificación de los 12 exones del gen *GRN* se realizó empleando DNA genómico, mediante el empleo de oligonucleótidos específicos que flanquean no solo los exones si no también secuencias intrónicas (Los oligos se encuentran en el apéndice sección B). Las condiciones así como los reactivos empleados, se presentan en el anexo final en la sección de reactivos.

Purificación de los productos de PCR.

La purificación de los productos de PCR, se realizó mediante el estuche comercial de purificación Wizard® *SV Gel and PCR Clean-Up System (Primega®)*. La metodología se detalla en la sección “A” del apéndice.

Reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando el estuche comercial de secuenciación *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®)*. Las condiciones así como los reactivos empleados, se presentan en el anexo final en la sección de reactivos.

Purificación de los productos de la reacción de secuenciación.

La purificación de los productos de la reacción de secuenciación se realizó por medio de columnas de purificación *Centri-sep*. La metodología se detalla en la sección “A” del apéndice.

Secuenciación Automatizada.

El producto secó purificado se hidrató con 15 µL de Formamida ultrapura, después se transfirió a una placa de 96 pozos. Se desnaturalizó a una temperatura de 94°C durante un tiempo de 5 minutos, para después llevarla al secuenciador *DNA AB3130 (Applied Biosystems®)* y que fuera analizada.

Análisis de las secuencias.

Las secuencias que se obtuvieron a través del secuenciador automatizado, fueron analizadas empleando el programa “Sequencher DNA Sequence Analysis Software” que se descargó del sitio web “Genecode” [145].

Análisis del gen *C9orf72* por medio de la técnica de fragmentos.

El método que se empleó para el análisis de la expansión del repetido “GGGGCC” en el gen *C9orf72* se realizó mediante la técnica de análisis de fragmentos. En esta técnica se utilizaron oligonucleótidos específicos que flanquean la secuencia, uno de estos marcado con el fluoróforo “FAM”; estos oligonucleótidos fueron previamente reportados por Renton y cols. [104] Basados en otras técnicas para análisis de fragmentos [100 y 101]. La metodología se detalla en la sección “A” del apéndice.

Análisis de Fragmentos.

Los resultados obtenidos por medio de la reacción de fragmentos se analizaron utilizando el programa Peak Scanner™ Software v1.0, que se descargó del sitio web de “Life Technologies®” [146].

VIII. Resultados.

8.1 Variantes identificadas en el gen GRN.

En los pacientes con DFT se identificó un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región promotora, en la cual hay una delección de una citosina reportada como “rs17523519”; este SNP se identificó en 33 pacientes (19 pacientes de manera homocigota y 14 de manera heterocigota). En el anexo D se muestran los electroferogramas correspondientes a la forma heterocigota, homocigota de este SNP así como un electroferograma control.

En solo un paciente se identificó el SNP rs60100877 de manera heterocigota dentro de la región intrónica que se encuentra entre el exón 3 y 4, el electroferograma se presenta en el anexo D.

En 7 pacientes se identificó el SNP rs9897526 de manera heterocigota dentro de la región intrónica entre el exón 3 y 4 el cual provoca el cambio de una guanina por una adenina, el electroferograma de este SNP se presenta en el anexo D.

En solo un paciente se identificó la inserción de una citosina en el exón 2 de manera heterocigota (c.88_89insC), la cual aún no ha sido descrita conduciendo a que se forme un codón de paro prematuro cambia el marco de lectura, en este paciente también aparece el SNP rs17523519. En la figura 15 se muestra el electroferograma de la inserción y uno control.

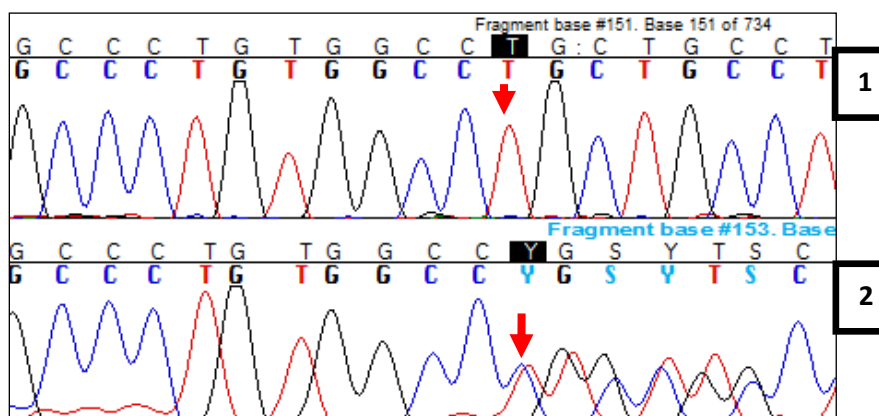


Figura 15. Electroferograma parcial que presenta la inserción de una citosina (c.88_89insC). El electroferograma 1 es un control. El electroferograma 2 muestra la inserción, que se presenta de manera heterocigota.

En el exón 5 se identificaron 4 pacientes con el SNP rs25646 de forma heterocigota que es el cambio de una timina por una citosina. En el anexo D se muestra el electroferograma de este SNP.

En la parte intrónica entre el exón 5 y 6, en 10 pacientes se identificó el SNP rs850713 que es el cambio de una guanina por una adenina de forma heterocigota y en 6 pacientes de forma homocigota. En el anexo D se muestra el electroferograma de este SNP.

Entre el exón 8 y 9 se identificó el SNP rs72824736, el cual se identificó en tres pacientes de manera heterocigota, es un cambio de una guanina por una alanina. El electroferograma parcial del SNP se muestra en el anexo D.

En el exón 11 se identificó la mutación previamente reportada como CM084962 que es el cambio de una guanina por una adenina lo que lleva al cambio de arginina por glutamina en el codón 418 (p.Arg418Gln), esta mutación no solo se asocia al desarrollo de DFT sino también como factor de riesgo para padecer ELA. En la figura 16 se muestra e electroferograma de esta mutación.

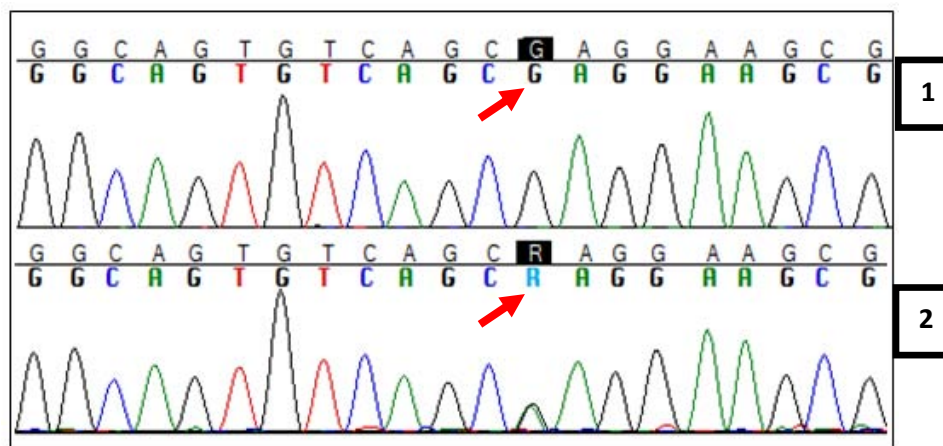


Figura 16. Electroferogramas parciales. 1. Electroferograma parcial de un control. 2. Electroferograma parcial donde se muestra la mutación CM084962 de manera heterocigota.

En el exón 12 en 13 pacientes se identificó el polimorfismo rs5848 que es el cambio de una citosina por una timina de forma heterocigota y sólo 1 de manera homocigota. En la figura 17 se muestra el electroferograma parcial de este SNP.

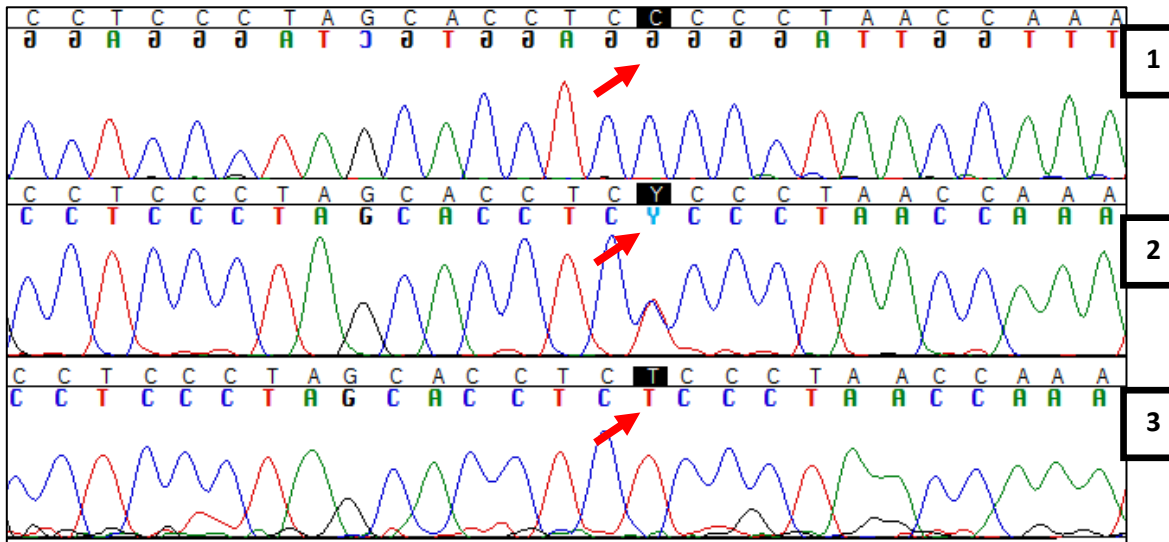


Figura 17. Electroferogramas parciales. El electroferograma parcial 1 es un control. El electroferograma parcial 2 muestra el SNP rs5848 de manera heterocigota. El electroferograma parcial 3 muestra al polimorfismo de manera homocigota.

En el exón 12 se identificó una nueva variante, este cambio es de una guanina por una adenina en el codón 588 lo que lleva al cambio de una alanina por una treonina (p.A588T). En la figura 24 se muestra el electroferograma parcial de esta variante.

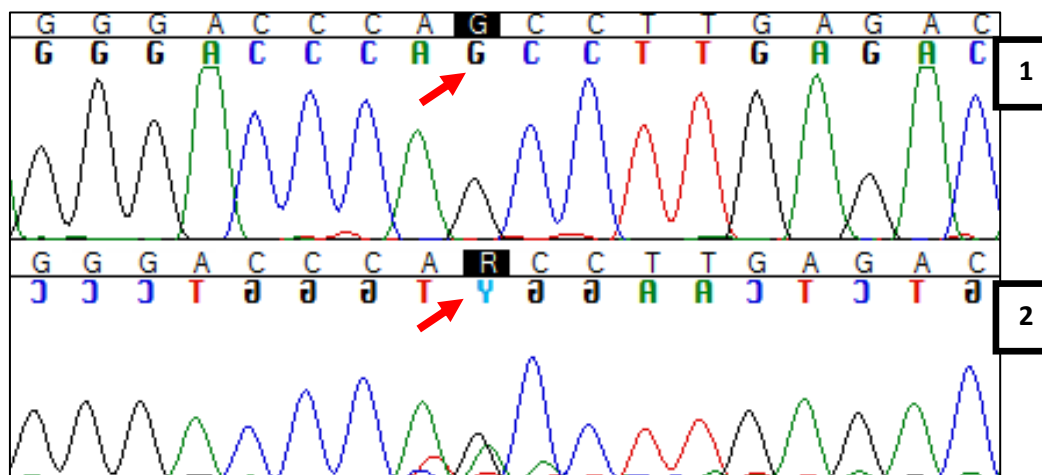


Figura 18. Electroferogramas parciales. El electroferograma parcial 1 es un control. El electroferograma parcial 2 muestra la mutación p.A588T cambio de una guanina por alanina de manera heterocigota.

Como se mostró, se identificaron diferentes variantes génicas en el gen *GRN*; sin embargo se encontró más de una sola variante en un solo paciente. En la tabla 10 se presentan lo antes mencionado.

Polimorfismos y mutaciones.	
No. de casos	1 rs17523519(Hom), c.88_89insC
	1 rs8507(Hom), rs5848(Het)
	2 rs9897523(Het)
	4 rs850713(Het)
	2 rs17523519(Hom), rs850713(Het)
	9 rs17523519(Hom)
	7 rs17523519(Het)
	1 rs60100877 (Het)
	2 rs17523519(Hom), rs850713(Het), rs25646(Het)
	1 rs8507(Hom), rs5848(Hom)
	1 rs17523519(Het), rs850713(Het), rs25646(Het)
	2 rs17523519(Hom), rs850713(Hom)
	2 rs17523519(Het), rs5848(Het)
	1 rs850713(Hom), p.A588T
	2 rs17523519(Hom), rs5848(Het)
	1 rs59897526(Het), rs72824736(Het), CM084962, rs5848(Het)
	1 rs17523519(Hom), rs72824736(Het)
	1 rs17523519(Het), rs72824736(Het)
	1 rs9897526(Het), rs5848(Het)
	2 rs850713(Het), rs5848(het)
	2 rs5848(Het)
	1 rs25646(Het), rs850713(Hom), rs5848(Het)
	2 rs17523519(Het), rs9897526(Het)
	1 rs17523519(Het), rs5848(Het)

Tabla 4. Resumen de las variantes identificadas en el gen *GRN* y se observa como más de una variante se identifica en un solo paciente, ya sea que estén en estado homocigoto (Hom) o en estado heterocigoto (Het).

8.2 Variantes identificadas en C9orf72.

Antes de realizar el análisis de fragmentos se realizó secuenciación automatizada de la región de interés, empleando los oligonucleótidos descritos, para corroborar que éstos se encontraban en la región de interés, en la figura 19 se muestra el electroferograma obtenido.

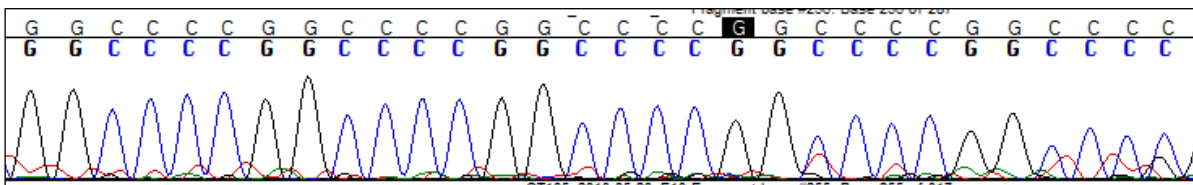


Figura 19. Electroferograma parcial de la secuencia reversa del expandido "CCCCGG".

Dado que los oligonucleótidos que se emplearon están en la secuencia de interés, se procedió a realizar el análisis de fragmentos de los pacientes con ELA y DFT, de éstos ninguno presento un expandido mayor a los 23 repetidos. En la figura 20 se ejemplifica uno de los resultados obtenidos en estos pacientes.

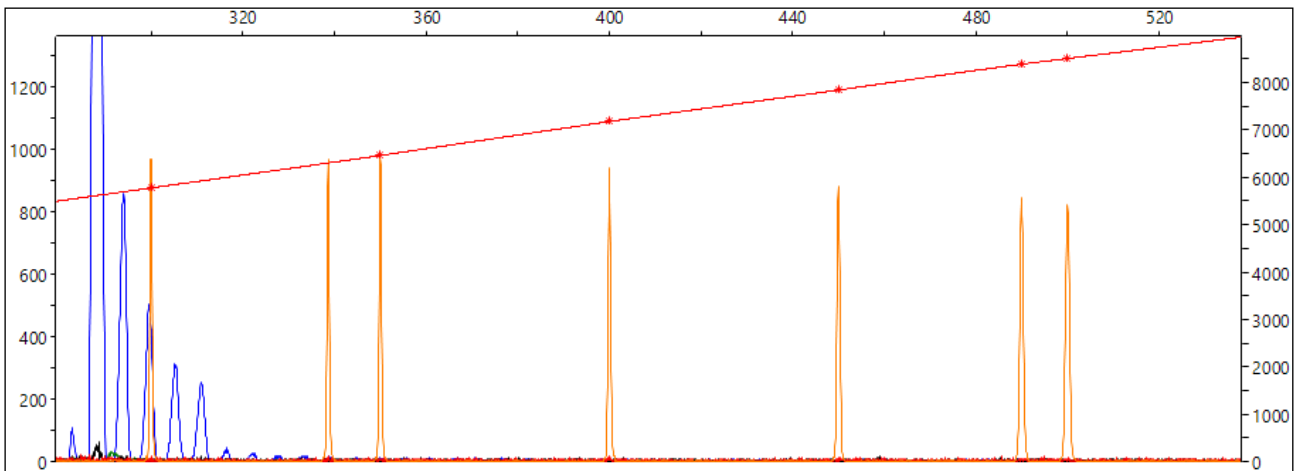


Figura 20. Se observa la imagen de uno de los resultados que se obtuvieron de la reacción de fragmentos utilizando cómo marcador "500 LIZ™". En este caso el paciente presenta 3 repetidos. Se explica en el anexo como se obtiene el número de repetidos.

Se muestra en la tabla 10 un resumen de los resultados obtenidos de las diferentes grupos analizados.

Población	Promedio del número de repetidos.	Rango
DFT	3.50	1-12
ELA	5.65	1-15
Controles	1.97	1-8

Tabla 5. Promedio y rango del número de repetidos, para cada una de las poblaciones estudiadas.

IX. Análisis de resultados.

La demencia frontotemporal y la esclerosis lateral amiotrófica son enfermedades muy diferentes, sin embargo se ha observado que comparten ciertas características clínicas. En este estudio se analizó el gen *GRN* el cual principalmente se involucra en la DFT y un repetido en el gen *C9orf72* el cual lleva al desarrollo de un espectro entre DFT y la ELA.

9.1 *GRN*.

En el gen *GRN* se identificaron diferentes polimorfismos los cuales se describirán.

En la tabla 4 se resumen las variantes génicas identificadas en los pacientes con probable DFT. En la figura 21 se presenta la proporción del polimorfismo rs17523519 en nuestra población de estudio.

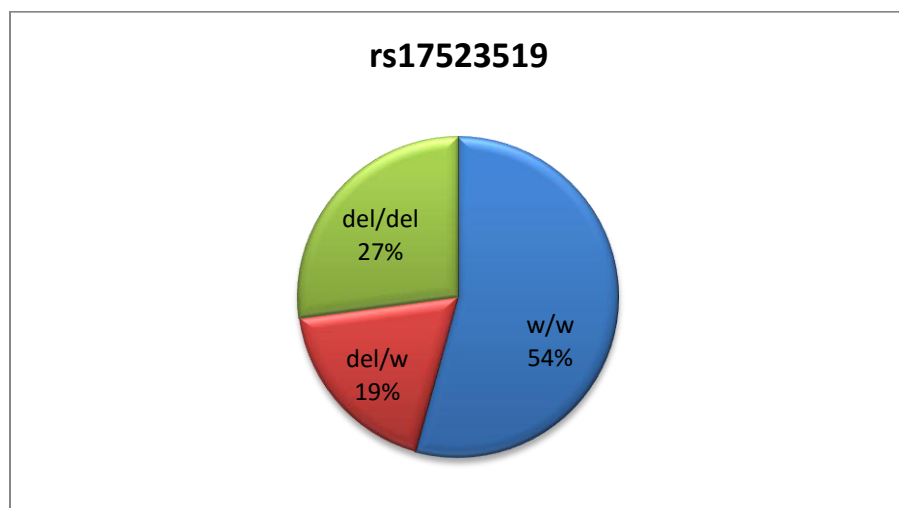


Figura 21. Proporción del polimorfismo rs17523519, con respecto a los pacientes estudiados.

La proporción de genotipos del polimorfismo rs17523519 en nuestra población tiene gran parecido con el de otras poblaciones en donde se ha estudiado, como la americana que para el genotipo homocigoto del/del se presenta en un 21% y en la asiática la cual para el genotipo es del/w y se presenta en un 15.7%, de acuerdo a los resultados que se obtuvieron en el proyecto de los mil genomas, que se consultó en la página Web de Ensemble [147].

En la figura 22 se muestra la proporción del polimorfismo rs850713.

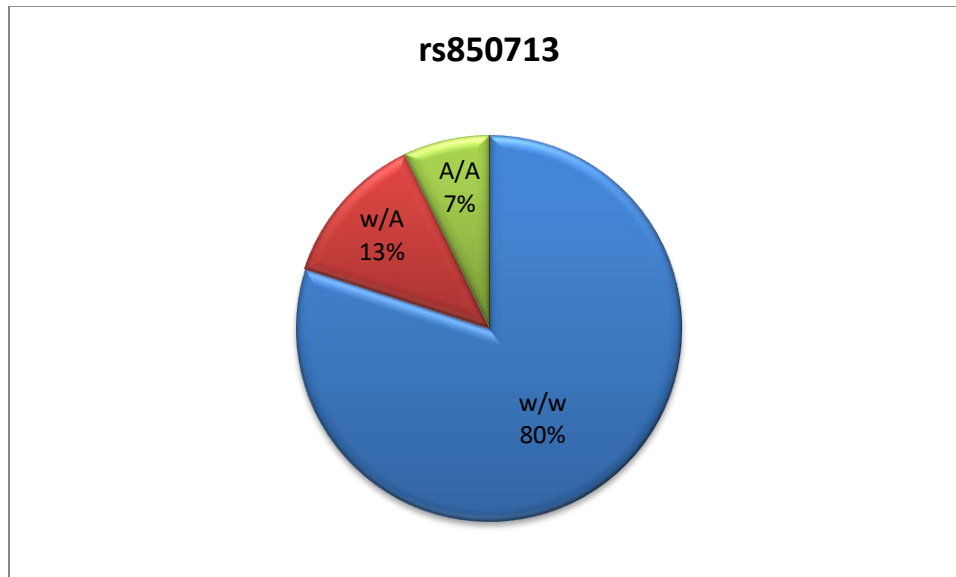


Figura 22. Proporción del polimorfismo rs850713, con respecto a nuestra población estudiada.

La proporción de genotipos del polimorfismo rs850713 en nuestra población tiene gran parecido con el de otras poblaciones estudiadas, como los mexicano-americanos en Estados Unidos que el genotipo A/A se presenta en un 7.6% (estos resultados se obtuvieron en el proyecto de los mil genomas, consultados en la página Web de Ensemble [147]), mientras que en nuestra muestra fue del 7%.

El polimorfismo rs850713 se ha asociado en un estudio hecho por Viswanathan y cols. [148] al género masculino junto con el genotipo APOE ϵ 4 como posible riesgo para el desarrollo de Alzheimer; lo que sugiere que la variabilidad genética en el gen *GRN* puede no solo llevar al desarrollo de la DFT sino también a desarrollar otras enfermedades como Alzheimer bajo ciertas condiciones, sin embargo se necesita un mayor estudio o confirmar con otros. Un estudio realizado por Sleegers y cols, en pacientes con ELA-DFT en población belga, se identificó que las variantes comunes (rs9897526, rs34424835 y rs850713) se han asociado significativamente con una reducción en la edad de inicio y una menor supervivencia en los pacientes [149].

En la figura 23 se muestra la proporción del polimorfismo rs9897526.

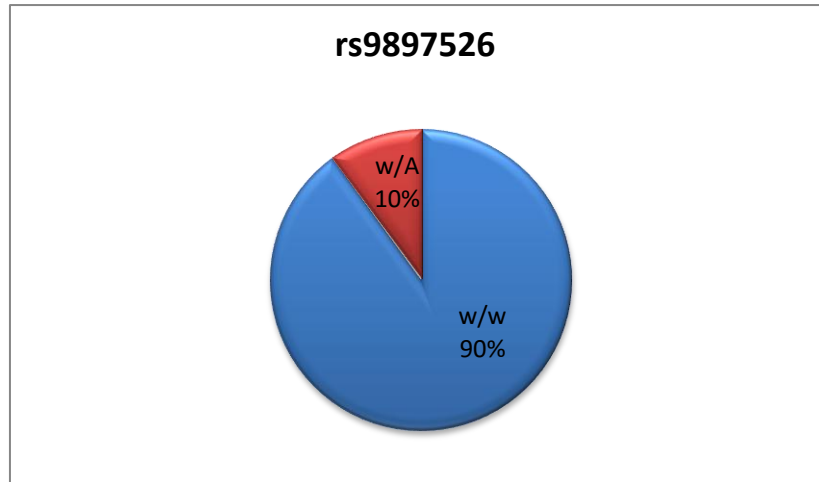


Figura 23. Proporción del polimorfismo rs9897526 con respecto a nuestro grupo de estudio.

La frecuencia de este polimorfismo respecto a otras poblaciones es similar, particularmente con población china, donde presentan la misma proporción [147]. La información que se tiene sobre este polimorfismo y su asociación con el riesgo para desarrollar ELA; la cual hasta el momento es contradictoria, ya que Viswanathan y cols. [149] refiere que este afecta la edad de inicio para desarrollar DFT al reducirla; mientras que el grupo de Pickering-Brown y cols [150] observó que este polimorfismo retrasa la edad de inicio para desarrollar DFT. En el estudio de Fenoglio C. y cols, este polimorfismo se asocia con Alzheimer, anticipando la edad de inicio en pacientes [151].

En nuestro estudio el polimorfismo rs60100877 sólo se identificó en un paciente de manera heterocigota, lo que representa 1.4 % de la muestra población estudiada, esta proporción es parecida a otras poblaciones incluidas en el proyecto de los 1000 genomas [147], y en donde ninguna población presenta el genotipo homocigoto para este polimorfismo. Este polimorfismo en un estudio realizado por Slegers y cols, es considerado como factor de riesgo para el desarrollo de la ELA en población belga sin embargo hacen falta más estudios para corroborarlo [149].

La proporción del polimorfismo rs25646 es baja dado que solo se encontró en 4 pacientes de manera heterocigota lo que representa el 5.7% de nuestra población estudiada y tiene mucho parecido con la proporción reportada en otras poblaciones en donde no se encuentra un genotipo homocigoto para este polimorfismo a excepción de la población asiática (Reportado en el proyecto de los mil genomas) [146], en un estudio realizado por Slegers y cols, considera a este polimorfismo como factor de riesgo para el desarrollo de la ELA, en población belga [149].

El polimorfismo rs72824736 en nuestra muestra analizada también presenta una baja proporción dado que se identificó solo en 3 pacientes de manera heterocigota, lo que representa el 4.3% de la muestra de estudio. Los resultados son similares a lo reportado en otras poblaciones como en la población mexicano-americana, donde es poco frecuente encontrar un genotipo homocigoto para este polimorfismo (reportado por el proyecto de los mil genomas) [147].

Se muestra en la figura 24 la proporción del polimorfismo rs5848.

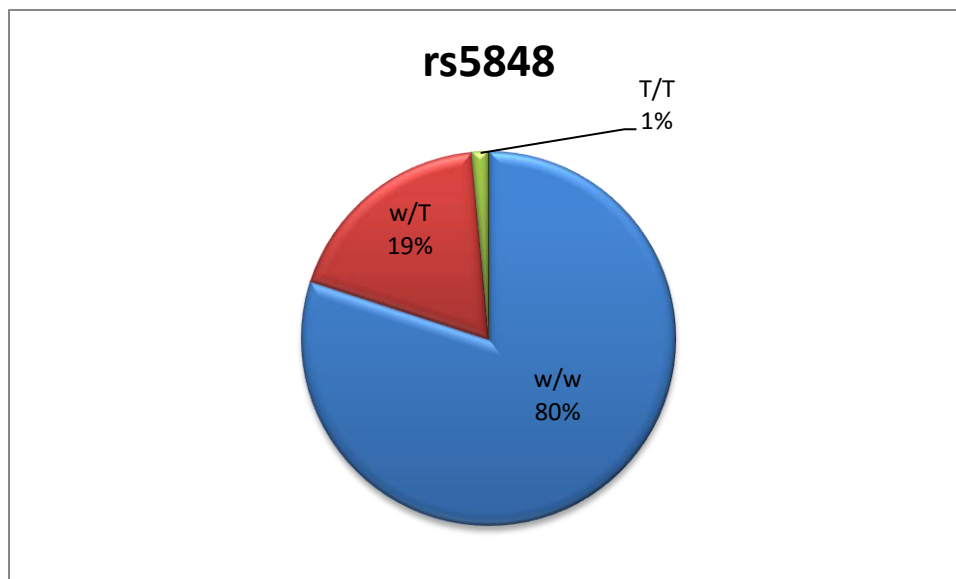


Figura 24. Proporción del polimorfismo rs5848 con base a la población de estudio.

El polimorfismo rs5848 se ha reportado como un factor de riesgo para el desarrollo de la DFT, por que ocasiona que los niveles de Progranulina disminuyan de tal manera que sólo sea un factor de riesgo. Este polimorfismo se encuentra en la región 3'-UTR de *GRN*, dentro de un sitio de unión para el miRNA-659. Este miRNA ocasiona que haya una reducción de los niveles de progranulina y se ha reportado en base a un análisis *in-silico* en donde los homocigotos para este polimorfismo dan como resultado que el miRNA se una de manera más fuerte al gen de *GRN*, ocasionando la reducción de los niveles de progranulina [152, 153]. El polimorfismo tiene una frecuencia similar a la reportada en el proyecto de los 1000 genomas [147], especialmente con la población de México-americana.

No solo se identificaron polimorfismos en el gen *GRN*, también se identificaron 3 mutaciones patogénicas:

En un paciente se identificó la mutación c.88_89insC, la cual no ha sido reportada. Esta inserción produce un codón de paro prematuro, se realizó en estudio *in silico* empleando la herramienta bioinformática "Translate tool" empleando el sitio web de Expasy [154] los resultados se muestra en la tabla 11.

	Secuencia de aminoácidos.
Secuencia control.	Sentido 5'3' Met W T L V S W V A L T A G L V A G T R C P D G Q F C P V A C C L D P G G A S Y S C C R P L L D K W P T T L S R H L G G P C Q V D A H C S A G H S C I F T V S
Secuencia mutada (c.88_89insC).	Sentido 5'3' Met W T L V S W V A L T A G L V A G T R C P D G Q F C P V A L L P G P R R S Q L Q L L P S P S G Q Met A H N T E Q A S G W P L P G Stop C P L L C R P L L H L Y R L R

Tabla 6. Resultado obtenido de "Translate tool" [153]. En amarillo está señalado el aminoácido metionina el cual marca el inicio de la secuencia, sin embargo en la secuencia mutada hay dos sitios para la traducción. En rojo se encuentra señalado el codón de paro, el cual se observa en la secuencia donde se encuentra la mutación.

En segundo paciente se identificó el cambio en el nucleótido guanina por el de una adenina, lo que a nivel de proteína lleva al cambio de alanina por una treonina en la posición 588 (p.A588T). Empleando las herramientas bioinformáticas *PolyPhen-2* [155] y *SIFT* [156] (las cuales permiten predecir las consecuencias funcionales debidas a un cambio de aminoácido) se predijo que esta mutación no es dañina. El resultado obtenido de la herramienta bioinformática *PolyPhen-2* se muestran en las figuras 25.

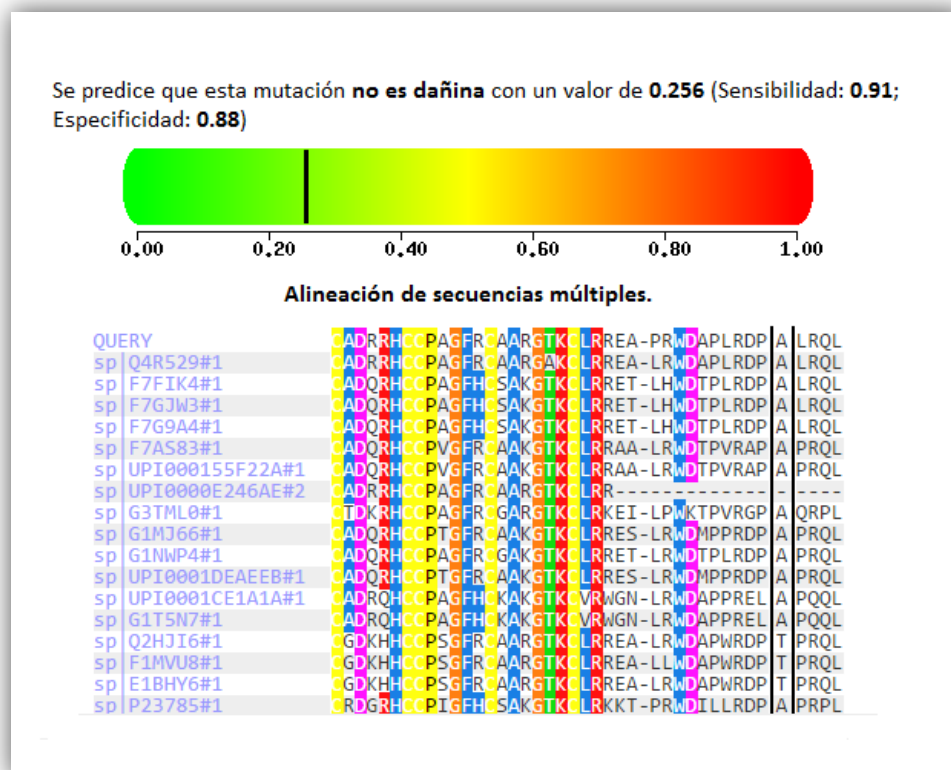


Figura 25. Se muestra el resultado del análisis *in silico* de la variante génica p.A588T por el programa PolyPhen-2, el cual muestra que la mutación es benigna. También se observa que en la alineación de secuencias múltiples, el cambio cae en una región no conservada además de encontrarse al final de la secuencia de aminoácidos.

Lo que predice la herramienta bioinformática *SIFT* [156] es que esta mutación es tolerable con un valor SIFT de 0.24; el cual es una puntuación que el programa maneja para su algoritmo (la sustitución de aminoácidos se prevé perjudicial si la puntuación es $\leq 0,05$, y tolerada si la puntuación es $> 0,05$).

En el tercer paciente se identificó el cambio de una guanina por adenina, lo que lleva al cambio de aminoácido de arginina a glutamina, ya reportado como CM084962 (p.R418Q) por el grupo de trabajo de Slegers y cols, la cual se ve involucrada en el desarrollo de ELA-DFT, sin embargo hace falta un estudio más grande para corroborarlo. Se realizó el estudio *in silico* de esta mutación empleando las herramientas bioinformáticas *PolyPhen-2* [155] y *SIFT* [156], que nos permiten predecir las consecuencias funcionales debidas al cambio de aminoácido. *PolyPhen-2* [155] predice que es posiblemente dañina, como se muestra en la alineación de secuencias múltiples en la figura 26, se observa que la mutación se encuentra en una región poco conservada, no está al final de la secuencia y se encuentra cerca de un aminoácido conservado, por ello el programa predice que es posiblemente dañina sin embargo hacen falta estudios *in vivo* para confirmarlo.

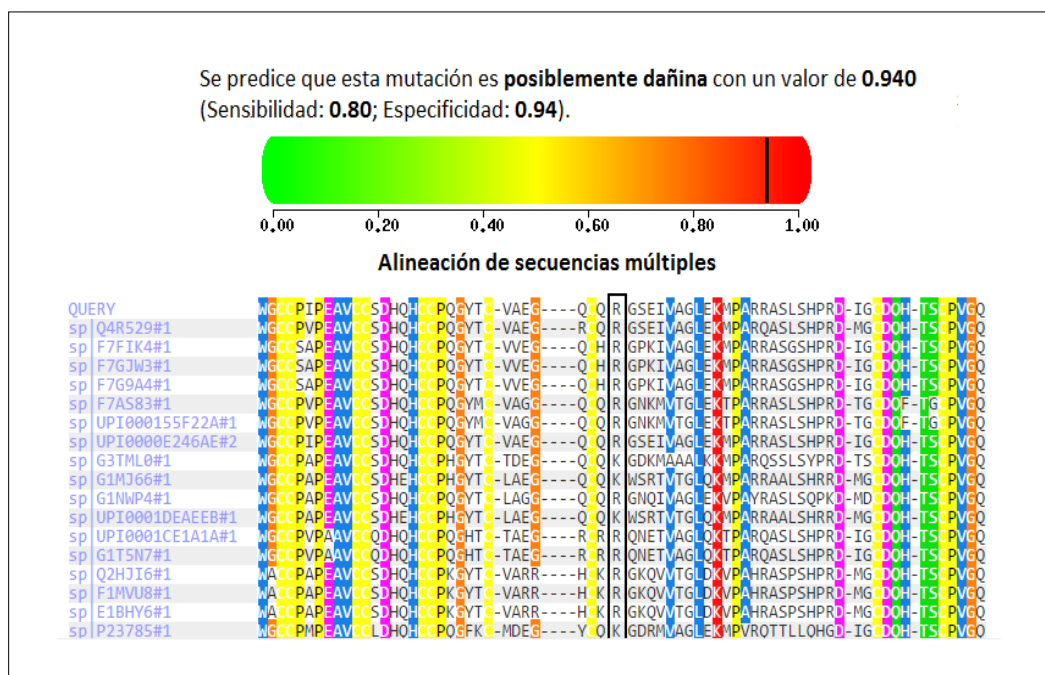


Figura 26. Se muestra el resultado del análisis *in silico* por el programa *PolyPhen-2*, el cual muestra que la mutación CM084962 es posiblemente dañina además del resultado de alineación de secuencias múltiples.

Por el otro lado la herramienta bioinformática *SIFT* predice que esta mutación es tolerable con un valor *SIFT* de 0.35 (la sustitución de aminoácidos se prevé perjudicial si la puntuación es $\leq 0,05$, y tolerada si la puntuación es $> 0,05$).

9.2 C9orf72.

El repetido identificado en el gen *C9orf72* en otras poblaciones explica gran parte de los casos de DFT que tienen un solapamiento con la Esclerosis Lateral Amiotrófica. En nuestra muestra estudiada ningún caso presentó una expansión mayor a los 23 repetidos. Se puede explicar esto ya que la expansión de este repetido mayor a los 23 se ha presentado como un efecto de fundador en la población finlandesa [104] y con una menor variación genética, comparada con la población mexicana, la cual muestra una gran variabilidad entre las diferentes regiones dentro del país.

En los 2 últimos meses se publicó un artículo por Rollinson y cols [157] donde reporta que una pequeña delección (10 pb) adyacente al repetido, ocasiona que se forme una fuerte estructura secundaria en la región lo que evita que la polimerasa lea a través de esta estructura. Los pacientes que presentan esta delección, muestran un número de repetidos (determinado mediante el análisis de fragmentos empleando los oligonucleótidos de Renton y cols. [100]) menor al que en verdad tienen, por lo que se sugiere utilizar los oligonucleótidos descritos por DeJesus-Hernandez y cols [101] los cuales permiten determinar el número de repetidos a pesar de la delección.

X. Conclusiones.

Se encontraron estas mutaciones en el gen *GNR* en la población mexicana tres mutaciones en tres diferentes casos con DFT; 1) la mutación c.88_89insC la cual aún no ha sido reportada y en los estudios *in silico* se predice que produce un codón de paro prematuro; 2) la mutación p.A588T que no ha sido reportada, sin embargo los estudios *In silico* predicen que no es dañina; 3) por último la mutación CM084962, la cual se ha asociado con el desarrollo de la ELA.

De los 10 diferentes polimorfismos identificados en el gen *GRN*; sólo el rs5848 ha resultado ser factor de riesgo para el desarrollo de la DFT cuando se presenta de manera homocigota.

En más de un paciente con DFT se identificó más de un SNP en el gen *GRN*, lo que puede sugerir la formación de un haplotipo el cual se encuentre involucrado en el desarrollo de la DFT, sin embargo haría falta hacer otro estudio para corroborar esto.

Ninguno de los casos con DFT y ELA presentó alelos expandidos mayor a los 23 repetidos en el gen *C9orf72* probablemente debido a las características genéticas de nuestra población.

En los pacientes que no presentaron alguna mutación en los genes de estudio, no se descarta la posibilidad de que existan otros genes mutados aún no identificados.

El trabajo contribuye a que se tenga un mejor conocimiento de la DFT y la ELA en la población mexicana, lo que puede repercutir en el mejor diagnóstico del paciente.

XI. Bibliografía.

1. Gabriele C, Dolciotti C, Picchi L, Bonucelli U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci* (2011); 32: 275-279.
2. Berchtold N, Cotman C. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer disease: Greco-Roman period in the 1960's. *Neurobiol Aging* (1998); 19: 173-189.
3. Warner, T. T., & Hammans, S. R. (2009). *Practical guide to neurogenetics*. Philadelphia: Ed. Saunders/Elsevier. Primera edición, 24-37.
4. Kerchner G.A. (2012). Nervous System Disorders. In S.J. McPhee, M.A. Papadakis, M.W. Rabow. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2012*. Ed. McGraw-Hill. Capítulo 24.
5. Carlsson CM, Gleason CE, Puglielli L, Asthana. Dementia Including Alzheimer's Disease. In: Halter JB, Ouslander JG, Tinetti ME, Studenski S, High KP, Asthana S, eds. *Hazzard's Geriatric Medicine and Gerontology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2009. Capítulo 65
6. Graff-Radford N. R., Woodruff B. K. Frontotemporal dementia. *Semin Neurol* (2007) 27:48–57.
7. Goedert M., Ghetti B., Spillantini M. G. Frontotemporal Dementia: Implications for Understanding Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012); 4: 1-15.
8. McKhann G. M., Albert M. S., Grossman M., Miller B., Dickson D., Trojanowski J. Q. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol* (2001); 11: 1803 – 1809.
9. Rademakers R., Neumann M., Mackenzie I. R. A. Recent advances in the molecular basis of Frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol* (2012); 8: 423-434.
10. Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K., Barker R. A., Brayne C. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* (2002); 58: 1615–1621.

11. Mercy L., Hodges J. R., Dawson K., Barker R. A., Brayne C. Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology* (2008); 71: 1496–1499.
12. Hodges J. R., Davies R., Xuereb J., Kril J., Halliday G. Survival in frontotemporal dementia. *Neurology* (2003); 61: 349–354.
13. Johnson J. K., Diehl J., Mendez M. F., Neuhaus J., Shapira J. S., Forman M., et al. Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Arch Neurol.* (2005); 62: 925 – 930.
14. Roberson E. D., Hesse J. H., Rose K. D., et al. Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology* (2005); 65: 719–725.
15. Gustafson L. Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. II. Clinical picture and differential diagnosis. *Arch Gerontol Geriatr* (1987); 6: 209–223.
16. Neary D., Snowden J. S., Northen B., Goulding P. Dementia of frontal type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1988); 51: 353–361.
17. Snowden J. S., Goulding P. J., Neary D. Semantic dementia: A form of circumscribed atrophy. *Behav Neurol.* (1989); 2: 167–182.
18. Hodges J. R., Patterson K. Semantic dementia: A unique clinicopathological syndrome. *Lancet Neurol* (2007); 6: 1004– 1014.
19. Grossman M., Mikanin J., Onishi K., Hughes E., D’Esposito M., Ding XS., Alavi A., Reivich M. Progressive non-fluent aphasia: Language, cognitive, and PET measures contrasted with probable Alzheimer disease. *J Cogn Neurosci* (1996); 8: 135–154.
20. Mesulam M. M. Primary progressive aphasia. *Ann Neurol.* (2001); 49: 425–432.
21. Weintraub S, Rubin NP, Mesulam M-M. Primary progressive aphasia: longitudinal course, neuropsychological profile, and language features. *Arch Neurol.* 1990;47:1329–1335.
22. Gunnarsson L. G., Dahlbom K., Strandman E. Motor neuron disease and dementia reported among 13 members of a single family. *Acta Neurol Scand* (1991); 84: 429–433.

23. Cairns N. J., Bigio E. H., Mackenzie I. R., et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* (2007); 114: 5–22.
24. Alzheimer A. Uber eigenartige Krankheitsfalle des sparteren Alters. *Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* (1911); 4: 356–385.
25. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* (1989); 8: 393–399.
26. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (2006); 314: 130–133.
27. Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, et al. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am J Pathol* (2007); 171: 227–240.
28. Roeber S, Mackenzie IR, Kretzschmar HA, et al. TDP-43-negative FTLD-U is a significant new clinico-pathological subtype of FTLD. *Acta Neuropathol* (2008); 116: 147–157.
29. Neumann M, Rademakers R, Roeber S, et al. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* (2009); 132: 2922–2931.
30. Rosso S. M., Donker Kaat L., Baks T., et al. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain*. (2003); 126: 2016-2022.
31. Ferrari R., Hardy J., Momeni P. Frontotemporal Dementia: From mendelian genetics towards genome wide association studies. *J Mol Neurosci*. (2011); 45: 500-515.
32. Galimberti D., Scarpini E. Genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Frontiers in Neurology* (2012); 3: 201-207.

33. Rademakers R., Hutton M. The Genetics of Frontotemporal Lobar Degeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports* (2007); 7: 434–442.
34. Shen L., Bagyinszky E., Youn Y., An A. S. S., Kim S. Y. Genetic Factors in Frontotemporal Dementia: A Review *Toxicol. Environ. Health. Sci.*(2013); 5:113-130.
35. Seelaar H., Rohrer J. D., Pijnenburg Y. A. L., Fox N. C., Van Swieten J.C. Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2011); 82: 476-486
36. Mackenzie I. R. A., Rademakers R., Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and Frontotemporal demntia. *Lancet Neurol* (2010); 9: 995–1007.
37. Ling SC., Polymenidou M., Cleveland D. W. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* (2013); 79: 416-438.
38. Petkau T. L., Leavitt B. R. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* (2014); 37: 388 - 398.
39. Zhu J., Nathan C., Jin W., Sim D., Ashcroft G. S., Wahl S. M., Lacomis L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wright C. D., Ding A. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* (2002); 111: 867 – 878.
40. He, Z., Bateman A. Progranulin (granulin—epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J. Mol. Med.* (2003); 81: 600 – 612.
41. Baker M., Mackenzie I. R., Pickering-Brown S. M., Gass J., Rademakers R., Lindholm C., Snowden J., Adamson J., Sadovnick D., Rollinson S., Cannon A., Dwosh E., Neary D., Melquist S., Richardson A., Dickson D., Berger Z., Eriksen J., Robinson T., Zehr C., Dickey C. A., Crook R., McGowan E., Mann D., Boeve B., Feldman H., Hutton M. Mutation in progranulin cause tau-negative Frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* (2006); 442: 916-919.

42. Nicholson A. M., Gass J., Petrucelli L., Rademakers R. Progranulin axis and recent developments in frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimer's Research & Therapy* (2012); 4: 1-4.
43. Smout M. J., Mulvenna J. P., Jones M. K., Loukas A. Expression, refolding and purification of Ov-GRN-1, a granulin-like growth factor from the carcinogenic liver fluke, that causes proliferation of mammalian host cells. *Protein Expression and Purification* (2011); 79: 263–270.
44. "The human gene Mutation Data Base". <http://www.hgmd.org/>
45. Neumann M., Sampathu D. M., Kwong L. K., Truax A. C., Micsenyi M. C., Chou T. T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C. M., McCluskey L. F., Miller B. L., Masliah E., Mackenzie I. R., Feldman H., Feiden W., Kretschmar H. A., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (2006); 314: 130–133.
46. Daniel R., He Z., Carmichael K. P., Halper J. and Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J. Histochem. Cytochem.* (2000); 48: 999–1009.
47. Petkau, T.L. et al. Progranulin expression in the developing and adult murine brain. *J. Comp. Neurol.* (2010); 518: 3931–3947
48. He Z., Bateman A. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res.* (1999); 59, 3222–3229.
49. Feng, J. Q., Guo, F. J., Jiang, B. C., Zhang, Y., Frenkel, S., Wang, D. W., et al. Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis. *FASEB J.* (2010); 24: 1879–1892.
50. Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, Mische S, Li J, Marcu KB: IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem.* 2002; 277: 45129 - 45140.

51. Suzuki M., Yoshida S., Nishihara M. and Takahashi M. Identification of a sex steroid-inducible gene in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* (1998); 242: 127–130.
52. Naphade, S.B. et al. Progranulin expression is upregulated after spinal contusion in mice. *Acta Neuropathol.* (2010); 119: 123–133.
53. Chitramuthu B. P. et al. Progranulin modulates zebrafish motoneuron development in vivo and rescues truncation defects associated with knockdown of Survival motor neuron 1. *Mol. Neurodegener.* (2010); 5: 41.
54. Laird A. S. et al. Progranulin is neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PLoS ONE* (2010); 5: e13368
55. Petkau T. L., Leavitt B. R. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* (2014); 37: 388-398.
56. Wada R., Tiffet C. J. and Proia R. L. Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* (2000); 97: 10954–10959.
57. Byrnes, K.R. et al. Delayed inflammatory mRNA and protein expression after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation* (2011); 8: 130.
58. Yin F., Banerjee R., Thomas B., Zhou P., Qian L., Jia T., Ma X., Ma Y., Iadecola C., Beal M.F., Nathan C., Ding A. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *J. Exp. Med.* (2010); 207: 117-128.
59. Josephs K. A., Holton J. L., Rossor M. N., Godbolt A. K., Ozawa T., Strand K., et al. Frontotemporal lobar degeneration and ubiquitin immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2004); 30: 369–373.
60. Gijssels I., Van Broeckhoven C., Cruts M. Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Hum Mutat* (2008); 29: 1373–86.
61. van der Zee J., Rademakers R., Engelborghs S., Gijssels I., Bogaerts V., Vandenberghe R., Santens P., Caekebeke J., De Pooter T., Peeters K., Lubke U., Van den Broeck M., Martin J. J., Cruts M., De Deyn P.P., Van Broeckhoven C., Dermaut B. A Belgian ancestral haplotype harbours a

- highly prevalent mutation for 17q21-linked tau-negative FTLD. *Brain* (2006); 129: 841-852.
62. Baker M., Mackenzie I.R., Pickering-Brown S.M., Gass J., Rademakers R., Lindholm C., Snowden J., Adamson J., Sadovnick A.D., Rollinson S., Cannon A., Dwosh E., Neary D., Melquist S., Richardson A., Dickson D., Berger Z., Eriksen J., Robinson T., Zehr C., Dickey C.A., Crook R., McGowan E., Mann D., Boeve B., Feldman H., Hutton M. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* (2006); 442: 916-919.
63. Finch N., Baker M., Crook R., Swanson K., Kuntz K., Surtees R., Bisceglia G., Rovelet-Lecrux A., Boeve B., Petersen R. R., Dickson D. W., Younkin S. G., Deramecourt V., Crook J., Graff-Radford N. R., Rademakers R. Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain* (2009): 132; 583–591.
64. Colombrita, C. et al. TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *J. Biol. Chem.* (2012); 287: 15635–15647.
65. Zhang Y. J., Xu Y. F., Dickey C. A., Buratti E., Baralle F., Bailey R., Pickering-Brown S., Dickson D., Petrucelli L. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci.* (2007); 27: 10530–10534.
66. Nykjaer A., Lee R., Teng K. K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M. S., Jacobsen C., Kliemannel M., Schwarz E., Willnow T. E., Hempstead B. L., Petersen C. M. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* (2004); 427: 843–848.
67. Hu F., Padukkavidana T., Vægter C. B., Brady O. A., Zheng Y., Mackenzie I. R., Feldman H. H., Nykjaer A., Strittmatter S. M. Sortilin mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron.* (2010); 68 :654–667.

68. Gass, J. et al. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Mol. Neurodegener.* (2012); 7: 33.
69. Filiano A. J., Martens L. H., Young A. H., Warmus B. A., Zhou P., Grisell Diaz-Ramirez G., Jiao J., Zhang Z., Huang E. J., Gao FB., V. Farese Jr R., Roberson E. D. Dissociation of Frontotemporal Dementia–Related Deficits and Neuroinflammation in Progranulin Haploinsufficient Mice. *The Journal of Neuroscience* (2013); 12: 5352–5361.
70. Van Deerlin, V.M. et al. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat. Genet.* (2010); 42: 234–239.
71. Jiao J, Herl LD, Farese RV, Gao FB. MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia. *PLoS One.* (2010); 5: e10551.
72. Wang WX, et al. miR-107 regulates granulin/progranulin with implications for traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Am J Pathol.* (2010); 177: 334–345.
73. Rademakers R, et al. Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Gene t.* (2008); 17: 3631–3642.
74. Charcot J, Joffroy A Deux cas d’atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Pathol*(1869); 2: 744–754.
75. Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C. King A, Al-Sarraj S, van de Berg L. The genetic and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* (2012);124: 339-352.
76. Sathasivam S. Motor neuron disease: clinical features, diagnosis, diagnostic pitfalls and prognostic markers. *Singapore Med J.* 2010; 5:367–373.
77. Joyce I., Fratta., Fisher E., Acevedo-Arozena A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease towards the development of clinical treatments. *Mamm Genome* (2011); 22: 420-448.

78. Andersen PM, Al-Chalabi A Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* (2011); 7: 603–615.
79. Worms PM: The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* (2001); 191: 3-9.
80. Haverkamp L. J., Appel V., Appel S. H. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 1995; 118:707-719.
81. Li T. M., Alberman E., Swash M. Comparison of sporadic and familial disease amongst 580 cases of motor neuron disease. *J Neuro Neurosurg Psychiatry* (1988); 51: 778-784.
82. Pratt A., Getzoff D., Perry. Amyotrophic lateral sclerosis: update and new developments. *Degener neurol neuromuscul Dis.* (202); 2: 1-14
83. Ravits J., Appel S., Baloh R. H., Barohn R., Brooks B. R., Elman L., Floeter M. K. *et al.* Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: What phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* (2013); 14: 5–18.
84. Vucic S, Burke D, Kiernan MC. Diagnosis of motor neuron disease. In: Kiernan MC, ed. *The Motor Neuron Disease Handbook*. Sydney: Australasian Medical Publishing Company Limited (2007): 89–115.
85. Kiernan M., Vucic., Cheah B., Turner M., Eisen A., Hardiman O., Burrell J., Zoing M. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* (2011); 377: 942-955.
86. Pringle CE, Hudson AJ, Muñoz DG, Kiernan JA, Brown WF, Ebers GC. Primary Lateral Sclerosis – Clinical Features, Neuropathology and Diagnostic Criteria. *Brain* (1992); 115 : 495 – 520.
87. Kim WK, Liu X, Sandner J, Pasmanier M, Andrews J, Rowland LP, et al. Study of 962 patients indicates progressive muscular atrophy is a form of ALS. *Neurology.* (2009) ; 73 : 1686 – 92 .
88. Talbot K. Motor neuron disease: the bare essentials. *Pract Neurol* (2009); 9: 303–09.

89. Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* (2005); 65: 586–90.
90. Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* (2002); 59: 1077-9.
91. Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y, Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* (2006);351: 602 – 11.
92. Liscic R. M., Tenenholz Grinberg L., Zidar J., Gitcho M. A., Cairns N. J. ALS and FTL. Two faces of TDP-43 proteinopathy. *Eur J Neurol* (2008); 15: 772 – 80.
93. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (2006); 314: 130 – 133.
94. Johnston C. A., Stanton B. R., Turner M. R., et al. Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J Neurol* (2006); 253:1642–1643.
95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
96. Liscic R. M., Breljak D. Molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* (2011); 35: 370-372.
97. Iguchi Y., Katsuno M., Ikenaka K., Ishigaki S., Sobue G. Amyotrophic lateral sclerosis: an update on recent genetic insights. *J Neurol* (2013); 260:2917–2927
98. Gunnarsson L. G., Dahlbom K., Strandman E. Motor neuron disease and dementia reported among 13 members of a single family. *Acta Neurol Scand*(1991); 84:429–433.

99. Morita M., Al-Chalabi A., Andersen P. M., et al. A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology* (2006); 66: 839–844.
100. Renton A, Majounie E, Waite A, Sánchez J, Rollinson S, Gibbs R, Schymick J, Laaksovirta y *et al.* A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* (2011); 72: 257-268
101. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie I, Boeve B, Boxer A, Baker M, Rutherford N, *et al.* Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* (2011); 72: 245-256.
102. Levine T. P., Daniels R. D., Gatta A. T., Wong L. H., Hayes M. J. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics* (2013); 4:499–503.
103. Van Blitterswijk M., DeJesus-Hernandez M., Rademakers R. How do C9ORF72 repeat expansions cause amyotrophic lateral sclerosis and Frontotemporal dementia: can we learn from other noncoding repeat expansion disorders?. *Curr Opin Neurol* (2012); 25: 689-700.
104. Majounie E., Renton A. E., Mok K. , et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* (2012); 11: 323–330.
105. Huisman M. H., de Jong S. W., van Doormaal P. T., et al. Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2011); 82:1165–1170.
106. Seelaar H, Rohrer JD, Pijnenburg YA, et al. Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2011); 82: 476–486.
107. Chiò A., Borghero G., Restagno G., Mora G., Drepper C., Traynor B. J., Sendtner M. y *et al.* Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC

108. Mok K, Traynor B, Schymick J, et al. The chromosome 9 ALS and FTD locus is probably derived from a single founder. *Neurobiol Aging* (2011).
109. Bigio E. H., Weintraub S., Rademakers R., Baker M., Ahmadian S. S., Rademaker A., Weitner B. B., Mao Q., Lee K. H., Mishra M., Ganti R. A., Mesulam M. M. Frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy and chromosome 9p repeat expansion in C9ORF72: clinicopathologic correlation. *Neuropathology* (2013); 2: 122-133
110. Al-Sarraj S., King A., Troakes C., Smith B., Maekawa S., Bodi I., Rogelj B., Al-Chalabi A., Hortobágyi T., Shaw C. E. p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTLD and MND/ALS. *Acta Neuropathol* (2011); 122:691–702.
111. Orr H. T. Toxic RNA as a driver of disease in a common form of ALS and dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2013); 110: 7533–7534.
112. Ciura, S., Lattante, S., Le Ber, I., Latouche, M., Tostivint, H., Brice, A. and Kabashi, E. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* (2013); 74: 180–187.
113. Therrien, M., Rouleau, G.A., Dion, P.A., Parker, J.A., 2013. Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS One* 8, e83450.
114. Waite, A.J., Baumer, D., East, S., Neal, J., Morris, H.R., Ansorge, O., Blake, D.J., 2014. Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. *Neurobiol. Aging*.
115. Xi, Z., Zinman, L., Moreno, D., Schymick, J., Liang, Y., Sato, C., Zheng, Y., Ghani, M., Dib, S., Keith, J., Robertson, J., Rogaeva, E., Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. *Am. J. Hum. Genet* (2013); 92: 981-989.
116. Belzil, V.V., Bauer, P.O., Prudencio, M., Gendron, T.F., Stetler, C.T., Yan, I.K., Pregent, L., Daugherty, L., Baker, M.C., Rademakers, R., Boylan, K.,

- Patel, T.C., Dickson, D.W., Petrucelli, L. Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta Neuropathol* (2013); 126: 895-905.
117. Zhang D, Iyer LM, He F, Aravind L Discovery of novel DENN proteins: implications for the evolution of eukaryotic intracellular membrane structures and human disease. *Front Genet* (2012); 3: 283.
118. Vatovec S., Kovanda A., Rogeli B. Unconventional features of C9ORF72 expanded repeat in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration *Neurobiol Aging* (2014); 10:2421.e1-2421.e12.
119. Lee YB, Chen HJ, Peres JN, Gomez-Deza J, Attig J, Stalekar M, Troakes C, Nishimura AL, Scotter EL, Vance C, Adachi Y, Sardone V, Miller JW, Smith BN, Gallo JM, Ule J, Hirth F, Rogelj B, Houart C, Shaw C. E. Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell Rep.* (2013)
120. Mizielińska S, Lashley T, Norona FE, Clayton EL, Ridler CE, Fratta P, Isaacs A. M. C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. *Acta Neuropathol* (2013); 126(6):845–857.
121. Reddy, K., Zamiri, B., Stanley, S.Y.R., Macgregor, R.B., Pearson, C.E.,. The disease associated r(GGGGCC)_n repeat from the C9orf72 gene forms tract lengthdependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J. Biol. Chem* (2013); 288: 9860-9866.
122. Bugaut, A., and Balasubramanian, S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Res.* (2012); 40: 4727–4741.
123. Ma DK., Pui-Yan Ma V., Leung KH., Zhong HJ., He HZ., Shiu-Hin Chan D., Leung CH. Structure-Based Approaches Targeting Oncogene Promoter G-Quadruplexes. *From Bench to Clinic*, Dr. Yahwardiah Siregar (Ed.), <http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/structure-based-approaches-targeting-oncogene-promoter-g-quadruplexes>

124. Almeida, S., Gascon, E., Tran, H., Chou, H.J., Gendron, T.F., DeGroot, S., Tapper, A.R., Sellier, C., Charlet-Berguerand, N., Karydas, A., Seeley, W.W., Boxer, A.L., Petrucelli, L., Miller, B.L., Gao, F.-B. Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol* (2013); 126: 385-399.
125. Arrasate, M., Finkbeiner, S. Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* (2012); 238: 1-11.
126. Lee, J.E., Cooper, T.A. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem.Soc. Trans.* (2009); 37 (Pt 6): 1281-1286.
127. Orr, H.T. Cell biology of spinocerebellar ataxia. *J. Cell Biol.* (2012); 197: 167-177.
128. Pikkarainen M, Hartikainen P, Alafuzoff I. Ubiquitinated p62-positive, TDP-43-negative inclusions in cerebellum in frontotemporal lobar degeneration with TAR DNA binding protein 43. *Neuropathology.* (2010); 2:197–199.
129. Mori K, Lammich S, Mackenzie IR, Forne I, Zilow S, Kretzschmar H, Edbauer D, Janssens J, Kleinberger G, Cruts M, Herms J, Neumann M, Van Broeckhoven C, Arzberger T, Haass C hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with *C9orf72* mutations. *Acta Neuropathol* (2013); 3: 413–423
130. Takahama, K., Oyoshi, T. Specific binding of modified RGG domain in TLS/FUS to G-quadruplex RNA: tyrosines in RGG domain recognize 2'-OH of the riboses of loops in G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*(2013); 135: 18016-18019.
131. Takahama, K., Takada, A., Tada, S., Shimizu, M., Sayama, K., Kurokawa, R., Oyoshi, T. Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS. *Chem. Biol* (2013); 20: 341-350.
132. Calini D., Corrado L., Del Bo R., Gagliardi S., Pensato V., Verde F., Corti S., Mazzini L., Milani P., Castellotti B., Bertolin C., Sorarù G., Cereda C.,

- Comi G. P. D'Alfonso S., Gellera C., Ticozzi N., Landers J. E., Ratti A., Silani V., The SLAGEN Consortium. Analysis of hnRNPA1, A2/B1, and A3 genes in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*(2013); 2695: e11-e12
133. Xu, Z., Poidevin, M., Li, X., Li, Y., Shu, L., Nelson, D.L., Li, H., Hales, C.M., Gearing, M., Wingo, T.S., Jin, P. Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (2013); 110: 7778-7783.
134. Yamashita, T., Hideyama, T., Teramoto, S., Kwak, S. The abnormal processing of TDP-43 is not an upstream event of reduced ADAR2 activity in ALS motor neurons. *Neurosci. Res.* (2012); 73: 153-160.
135. Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A., Shaw, P.G., Kim, M.S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J.D., Wang, J. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature.* (2014); 507: 195-200.
136. Chiarella, S., De Cola, A., Scaglione, G.L., Carletti, E., Graziano, V., Barcaroli, D., Lo Sterzo, C., Di Matteo, A., Di Ilio, C., Falini, B., Arcovito, A., De Laurenzi, V., Federici, L. Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* (2013); 41: 3228-3239.
137. Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A., Nan, Z., Forster, C., Low, W.C., Schoser, B., Somia, N.V., Clark, H.B., Schmechel, S., Bitterman, P.B., Gourdon, G., Swanson, M.S., Moseley, M., Ranum, L.P. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011); 108: 260-265.
138. Mori K., Arzberger T., Grässer F. A., Gijssels I., May S., Rentzsch K., Weng SM., Schludi M. H., van der Zee J., Cruts M., Van Broeckhoven C., Kremmer E., Kretzschmar H. A., Haass C., Edbauer D. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated

- into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol* (2013); 126:881–893.
139. Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, Margolis J, Peterson M, Markowski TW, Ingram MA, Nan Z, Forster C, Low WC, Schoser B, Somia NV, Clark HB, Schmechel S, Bitterman PB, Gourdon G, Swanson MS, Moseley M, Ranum L. P. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011); 1: 260 – 265.
140. Zu T, Liu Y, Banez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, Miller TM, Harms MB, Falchook AE, Subramony SH, Ostrow LW, Rothstein JD, Troncoso JC, Ranum LP RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013.)
141. Gendron T. F., Belzil V. V., Zhang YJ., Petrucelli L. Mechanisms of toxicity in C9FTLD/ALS. *Acta Neuropathol* (2014); 127:359–376.
142. May S., Hornburg D., Schludi M. H., Arzberger T., Rentzsch K., M. Schwenk B. M., Grässer F. A., Mori K., Kremmer E., Banzhaf-Strathmann J., Mann M., Meissner F., Edbauer D. C9orf72 FTLD/ALS-associated Gly-Ala dipeptide repeat proteins cause neuronal toxicity and Unc119 sequestration. *Acta Neuropathol* (2014); 128:485–503.
143. Cleary J. D., Ranum L. PW. Repeat associated non-ATG (RAN) translation: new starts in microsatellite expansion disorders. *Current Opinion in Genetics & Development* (2014); 26:6–15
144. Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* (1988); 3: 1215.
145. “Gene Codes Corporation” - <http://www.genecodes.com/>.
146. “Life technologies” - <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4381867>.
147. “Ensembl Genome Browser” - <http://www.ensembl.org>

148. Viswanathan J., Helisalmi S., Haapasalo A., Soininen H., Hiltunen M. P3-270: An association study between progranulin gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*(2008); 4: T601.
149. Sleegers K., Brouwers N., Maurer-Stroh S., van Es MA., Van Damme P., van Vught PW., van der Zee J., Serneels S., De Pooter T., Van den Broeck M., Cruts M., Schymkowitz J., De Jonghe P., Rousseau F., van den Berg LH., Robberecht W., Van Broeckhoven C. Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* (2008); 22: 253-259.
150. Pickering-Brown S. M., Rollinson S., Plessis D. D., Morrison K. E., Anoop V., Richardson A. M. T., Neary D., Snowden J. S., Mann D. M. A. Frequency and clinical characteristics of progranulina mutation carriers in the Manchester Frontotemporal lobar degeneration cohort: comparison with patients with MAPT and no known mutations. *Brain* (2008); 131: 721-731.
151. Fenoglio C., Galimberti D., Cortini F., Kauwe JS., Cruchaga C., Venturelli E., Villa C., Serpente M., Scalabrini D., Mayo K., Piccio LM., Clerici F., Albani D., Mariani C., Forloni G., Bresolin N., Goate AM., Scarpini E. Rs5848 variant influences GRN mRNA levels in brain and peripheral mononuclear cells in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* (2009); 18: 603-612.
152. Hsiung GY., Fok A., Feldman HH., Rademakers R., Mackenzie IR. rs5848 polymorphism and serum progranulin level. *J Neurol Sci.* (2011); 15: 28-32.
153. Rademakers R., Eriksen JL., Baker M., Robinson T., Ahmed Z., Lincoln SJ., Finch N., Rutherford NJ., Crook RJ., Josephs KA., Boeve BF., Knopman DS., Petersen RC., Parisi JE., Caselli RJ., Wszolek ZK., Uitti RJ., Feldman H., Hutton ML., Mackenzie IR., Graff-Radford NR., Dickson DW. Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* (2008); 17: 3631-3642.
154. <http://web.expasy.org/translate/>.
155. "Polyphen-2" - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
156. "SIFT" - <http://sift.jcvi.org/>

157. Rollinson S., Bennion Callister J., Young K., Ryan SJ., Druyeh R., Rohrer JD., Snowden J., Richardson A., Jones M., Harris J., Davidson Y., Robinson A., Ealing J., Johnson JO., Traynor B., Mead S., Mann D., Pickering-Brown SM. A small deletion in C9orf72 hides a proportion of expansion carriers in FTLD. *Neurobiol Aging*. (2014): 1-5.

XII. Apéndice

A. Metodología.

Extracción de DNA.

La metodología se muestra a continuación:

Todos los procesos de centrifugación se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

1. Se transfirieron 3 mL de sangre periférica a un tubo Falcon con capacidad de 15mL, a este tubo se le adicionó 9mL de un Buffer para lisis de glóbulos rojos (BLGR), se homogenizó por inversión del tubo. Después se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm durante un periodo de tiempo de 6 minutos, posterior a esto se desechó el sobrenadante. Al botón se le agregó 1mL de BLGR, se homogenizó y se transfirió a un tubo de reacción con capacidad de 1.5 mL.
2. El homogenizado se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm durante un periodo de 2 minutos, el sobrenadante se desechó. Este paso se repitió hasta que el botón se encuentre limpio o libre de hemoglobina.
3. Al botón limpio se le adicionaron 570 μ L de una solución de NaCl a una concentración de 5mM y se homogenizó. Posterior a esto se adicionaron 40 μ L de una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y se homogenizó. Después se adicionaron 200 μ L de una solución de NaCl a una concentración de 7 M y se homogenizó. Este homogenizado se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante un lapso de 15 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de racción de 1.5 mL.
4. Al tubo de reacción del paso anterior se le adicionaron 700 μ L de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 49:1. El tubo se homogenizó y se centrifugó a una velocidad de 14000rpm durante un periodo de 15 minutos a una temperatura de 4°C. La fase acuosa de transfirió a un tubo de reacción de 1.5 mL.

5. Se adicionaron 900 μL de etanol absoluto a una temperatura de 4°C al tubo anterior, se homogenizó y se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante un lapso de 15 minutos. El sobrenadante que quedó se desechó, al botón se le adicionaron 700 μL de etanol al 70%. Se homogenizó y se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante un periodo de 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón se secó en un concentrado al vacío durante 30 minutos.
6. El botón seco, se resuspendió con 250 μL de agua estéril, se mantuvo con agitación constante a una temperatura de 60°C durante 2 horas. Después de este periodo a las muestras se les realizó el análisis de integridad y se cuantificaron. Las muestras que pasaron por los 2 procesos mencionados se conservaron a una temperatura de -20°C .

Cuantificación y análisis de integridad del DNA.

El gel de agarosa se elaboró utilizando la siguiente metodología:

1. En una balanza analítica se pesó 1 g de agarosa esta se pasó a un matraz, donde se le adicionó 100 mL de buffer SB 1x publicado por Brody y cols [99] constituido de Ácido bórico e NaOH.
2. La mezcla de agarosa y buffer, se calentó hasta que se formó una solución homogénea.
3. A la mezcla se le adicionó 1 μL de Bromuro de etidio (10mg/mL) para revelar el gel y se homogenizó.
4. Posteriormente se vertió en un molde para después colocar los peines que formaron los pozos en los que se cargó la muestra de DNA a analizar.
5. Se dejó solidificar a temperatura ambiente por una hora.

La electroforesis procedió de la siguiente manera:

1. El gel de agarosa se colocó en una cámara de electroforesis, se le adicionó buffer SB 1x hasta que se cubrió por completo el gel.
2. Se tomó un volumen de 2.0 μL de muestra de DNA y se mezcló con 2.0 μL de buffer de carga 10x (Azul de bromofenol, glicerol, xilencianol).

3. La mezcla anterior se depositó en uno de los pozos del gel. El paso anterior y este se realizó para cada una de las muestras que se analizó.
4. La electroforesis se realizó a 100 V, durante 30 minutos.
5. El gel se colocó en un transiluminador de luz UV y se tomó una fotografía para ser analizado, empleando un fotodocumentador.

Reacción de PCR para *GRN*.

En la tabla 3 se muestran los reactivos empleados en la PCR para la amplificación del gen *GRN*, así como la concentración y volumen necesario.

Reactivo	Concentración	Volumen
DNA	100 ng/μL	2.5 μL
<i>Master Mix</i>	10x	12.5 μL
Oligonucleótido sentido	10 μM	0.5 μL
Oligonucleótido antisentido	10 μM	0.5 μL
Agua libre de DNAsas	-----	9.0 μL
Volumen Final	-----	25.0 μL

Tabla 7. Reactivos que se emplearon en la elaboración de la PCR para el gen *GRN*.

Las condiciones empleadas para la PCR del gen *GRN* se presentan en la tabla 4.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94°C	15 min
Desnaturalización	94°C	1 min
Hibridación	55°C	1 min
Elongación	72°C	30 segs
Elongación Final	72°C	10 min
Conservación	4°C	∞

Repetir por 30 ciclos

Tabla 8. Temperaturas y tiempos empleados para la PCR del gen *GRN*.

Purificación de productos de PCR.

La metodología que se siguió se describe a continuación:

1. Se adicionó un volumen igual de la solución de unión a membrana que el de la reacción de PCR, al tubo de reacción y después se homogenizó.
2. Por otro lado se insertó una columna SV en un tubo colector.
3. La mezcla del primer paso, se transfirió a la minicolumna SV que se encuentra en el tubo colector, este se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
4. La minicolumna junto con el tubo colector se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm por 1 minuto. Después la solución que quedó en el tubo colector se desechó y la minicolumna se reinsertó en este.
5. Se adicionó un volumen de 700 μ L de la solución de lavado de membrana a la minicolumna SV. El tubo se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm por 1 minuto. Se desechó la solución que se depositó en el tubo colector y la minicolumna se reinsertó en este.
6. El paso 5 se repitió pero se adicionaron 500 μ de solución de lavado.
7. Se desechó la solución que se depositó en el tubo colector y la minicolumna vacía se reinsertó en este, después se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm por 1 minutos.
8. Se transfirió la minicolumna a un tubo de 1.5 mL.
9. Se adicionó un volumen de 25 μ L de agua libre de nucleasas. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Después se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto.
10. El filtrado se conservó a 4°C hasta su uso.

Reacción de secuenciación.

Los reactivos, las concentraciones de estos y los volúmenes empleados así como las condiciones que se utilizaron para la reacción se resumen en las tablas 5 y 6.

Reactivo	Concentración	Volumen
Oligonucleótido	10 μ M	1.0 μ L
Buffer	5x	3.5 μ L
Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing	10x	1.0 μ L
Agua libre de DNAsas	-----	12.5 μ L
Producto purificado de PCR	~100 ng/ μ L	2.0 μ L
Volumen final de reacción	-----	20 μ L

Tabla 9. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados en la reacción de secuenciación.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min
Desnaturalización	95 °C	30 segs
Hibridación	50 °C	30 segs
Elongación	60 °C	45 segs
Elongación Final	72 °C	5 min
Conservación	4 °C	∞

Repetir por 25 ciclos

Tabla 10. Temperaturas y tiempos utilizados en la realización de la reacción de secuenciación.

Purificación de los productos de secuenciación.

La metodología que se empleó se muestra a continuación:

1. Se hidrató la columna *Centri-Sep* con un volumen de 750 μ L de agua estéril, después de que se adicionó este volumen se eliminaron las burbujas.
2. Las columnas se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4°C durante 2 horas.

3. Posterior a este tiempo, se quitaron las tapas de la columna para drenar el líquido, después la columna se insertó en un tubo colector. Se centrifugó a una velocidad de 3,000 rpm por un lapso de 1 minuto.
4. Se desechó el líquido que se depositó en el tubo colector, la columna se insertó en un tubo de 1.5 mL.
5. El producto de la reacción de secuenciación se aplicó en el centro de la columna formada, se tuvo cuidado de no tocarla. Se centrifugó a una velocidad de 3,000 rpm durante 2 minutos.
6. El producto que resultó se secó empleando un concentrador de vacío.

Análisis de fragmentos.

En la tabla 7 y 8 se muestran las concentraciones, reactivos y volúmenes empleados en la reacción así como las temperaturas y tiempos respectivamente.

Reactivo	Concentración	Volumen
PCR Buffer	10 x	2.8 µL
Mezcla de dNTP's	10 µM	0.56 µL
Solución Q		5.0 µL
Deaza GTP	10 mmol	0.5 µL
MgCl ₂	25 µM	1.0 µL
DMSO	-----	2.0 µL
Mezcla de oligonucleótidos	-----	2.0 µL
Fast Start Taq (Roche®)		0.14 µL
DNA	~100 ng/µL	0.5 µL
Agua libre de DNAsas	-----	13 µL
Volumen Final	-----	28.0µL

Tabla 11. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados en la reacción de análisis de fragmentos. Descritos por Renton y cols. [65]

Fase	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	
Desnaturalización	98°C	20 seg	}
Hibridación	72°C	30 seg	
Elongación	98°C	90 seg	
			Repetir por 2 ciclos.
Desnaturalización	68°C	20 seg	}
Hibridación	72°C	30 seg	
Elongación	72°C	90 seg	
			Repetir por 3 ciclos.
Desnaturalización	98°C	20 seg	}
Hibridación	66°C	30 seg	
Elongación	72°C	90 seg	
			Repetir por 4 ciclos.
Desnaturalización	98°C	20 seg	}
Hibridación	64°C	30 seg	
Elongación	72°C	90 seg	
			Repetir por 5 ciclos.
Desnaturalización	98°C	20 seg	}
Hibridación	62°C	30 seg	
Elongación	72°C	90 seg	
			Repetir por 6 ciclos.
Desnaturalización	98°C	20 seg	}
Hibridación	60°C	30 seg	
Elongación	72°C	90 seg	
			Repetir por 7 ciclos.
Desnaturalización	98°C	20 seg	}
Hibridación	58°C	30 seg	
Elongación	72°C	90 seg	
			Repetir por 8 ciclos.
Desnaturalización	98°C	20 seg	}
Hibridación	56°C	30 seg	
Elongación	72°C	90 seg	
			Repetir por 5 ciclos.
Elongación final	72°C	10 min	
Refrigeración	4°C	∞	

Tabla 12. Temperaturas y tiempos utilizadas en el análisis de fragmentos descritos por Renton y cols. [65]

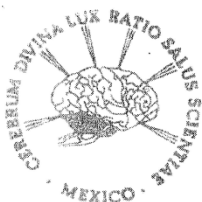
B. Reactivos

- ▣ Agarrosa Ultrapura (Bio-rad®).
- ▣ Bromuro de etidio: Promega® (10mg/mL)
- ▣ Cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción: 49:2.
- ▣ Kit de purificación de productos de PCR (Promega®).
- ▣ Kit de secuenciación: *Big-dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* (AB).
- ▣ Marcador de peso molecular: GeneRuler™ Low Range DNA Ladder y GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido de la región promotora del gen *GRN*:
5'-GCCAGCTCAGTAGCTCACAT-3'
5'-TATCAGAACCCCAAGGAGT-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 1-3 del gen *GRN*:
5'- GGGGCTAGGGTACTGAGTG-3'
5'- AGCAGGGCTGTTGCTTAGTA-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 4-6 del gen *GRN*:
5'- GCCTTAGTGTCACCCTCAA-3'
5'- CACTAGGGGGTAGCATGAAC-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 7-9 del gen *GRN*:
5'- TGATGCAGGGTTCATGCTA-3'
5'- GAGCTGGGTATCACCTATGG-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 10-11 del gen *GRN*:
5'- TACCCAGCTCTGACAGATTC-3'
5'- AGAGGGTTGGACGAGGT-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 11-12 del gen *GRN*:
5'- CCTGGATAGGGGAGCTAAG-3'
5'- AATGTGATACAGCCGATGTG-3'
- ▣ SDS 10%: Dodecil sulfato de sodio (10g/1L).
- ▣ Buffer SB 20%: Ácido Bórico (45g), NaOH (8g), agua (Cbp 1L).

C. Equipos y materiales.

- ◆ Agitador: Daigger Vortex Gene 2
- ◆ Balanza analítica: Denver Instrument Company AA-200.
- ◆ Cámara de electroforesis Labnet E1020-20
- ◆ Centrífuga: Eppendorf 5415 D, Eppendorf 5810 R.
- ◆ Concentrador al vacío: Eppendorf 5301
- ◆ Fotodocumentador Bio-Rad
- ◆ Fuente de poder: Bio-Rad Power Pac 3000.
- ◆ Micropipetas Gilson Pipetman.
- ◆ Secuenciador ABI PRISM 3130.
- ◆ Termociclador Applied Biosystems 2720.
- ◆ Transiluminador LabNet TM-26.

D. Consentimiento informado.



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

CONSENTIMIENTO INFORMADO
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

FECHA: ____/____/____

"Búsqueda de mutaciones en genes causales de demencia"

1. He sido informado/a que mi familiar tiene diagnóstico clínico de demencia tipo Alzheimer, fronto temporal o de rápida evolución.
2. He sido informado/a que en el departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se está realizando una investigación para saber si las familias con o sin componente genético, tienen mutaciones (alteraciones) en genes que causan diferentes tipos de demencia.
3. Los genes a estudiar en el presente proyecto son: gen precursor de la proteína Beta amiloide (PPA), presenilina 1 (PSEN1), proteína Tau (MAPT), progranulina (PGRN), el hexanucleótido repetido C90RFT72 y el gen de la proteína prion (PRNP).
4. He sido informado/a que si acepto participar en este estudio se me tomará una muestra de sangre periférica de 10 ml. de la cual se extraerá mi DNA que es el material hereditario y en él se estudiarán los genes arriba mencionados.
5. 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.
6. He sido informado/a que mi participación en el estudio no representa ningún costo para mí.
7. He sido informado/a que no recibiré remuneración económica por participar en este estudio
8. He sido informado/a que si en mi familia se encuentra alguna mutación, nos lo informarán, pero no se darán resultados predictivos, es decir, si en algún individuo sano de mi familia se le encuentra la mutación no se le comunicará, porque ésta investigación no incluye diagnóstico presintomático.
9. He sido informado/a que puedo abandonar el estudio en el momento que yo lo desee.
10. 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.
11. He leído esta carta cuidadosamente y he decidido participar libre y voluntariamente en el estudio.
12. Para cualquier duda o aclaración sobre este estudio puede comunicarse con la Dra. Ma. Elisa Alonso V. ó con la Dra. Petra Yescas G. al teléfono 56 06 38 22 Ext. 2022 ó 2002, respectivamente. También se puede dirigir con el Dr. Antonio Torres Ruiz, presidente del Comité de Bioética de nuestro Instituto a la extensión 5027.

Nombre del paciente ó familiar _____

Dirección _____

Teléfono _____

Responsable legal _____ Firma _____

Parentesco _____

Nombre y firma del 1er. testigo _____

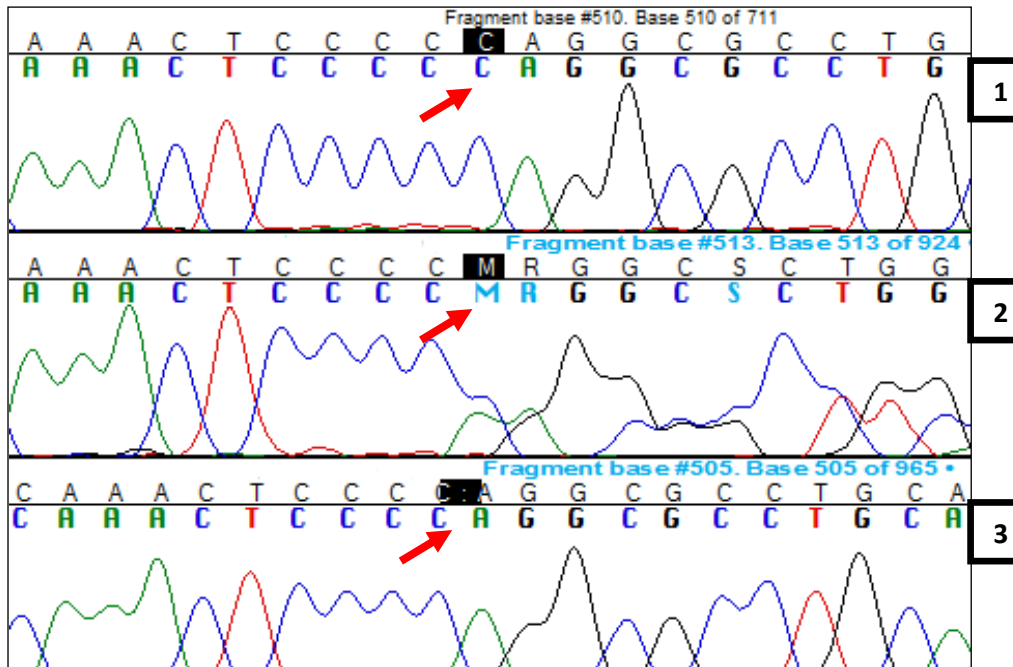
Nombre y firma del 2º testigo _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento _____

Firma _____

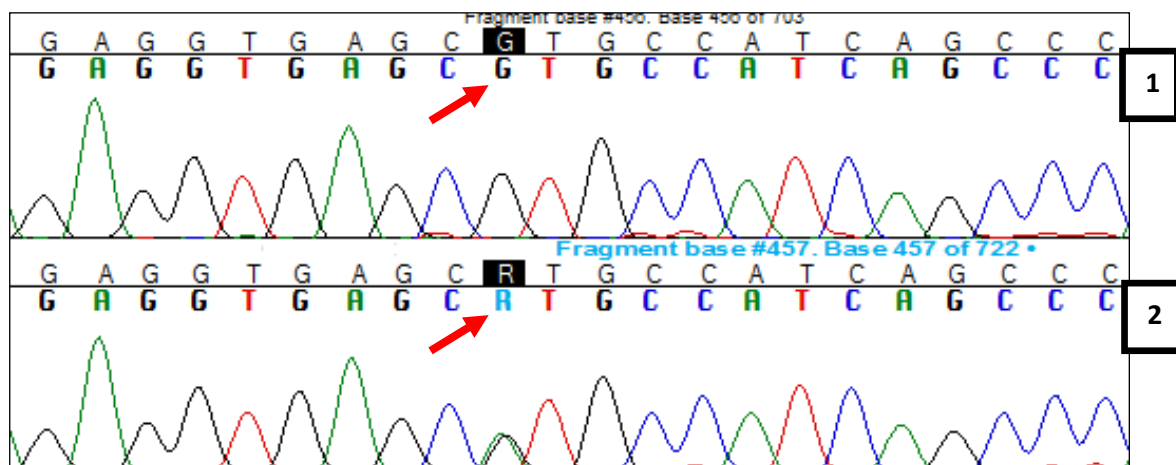
E. Electroferogramas parciales de los polimorfismos encontrados.

rs17523519.



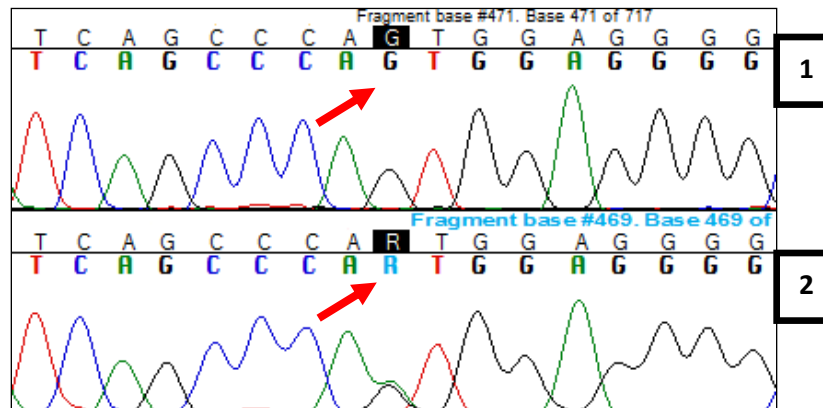
Electroferogramas parciales de los pacientes que presentan el SNP rs17523519. El electroferograma 1 es un control, el 2 presenta un caso heterocigoto y el 3 presenta un caso homocigoto.

rs 60100877.



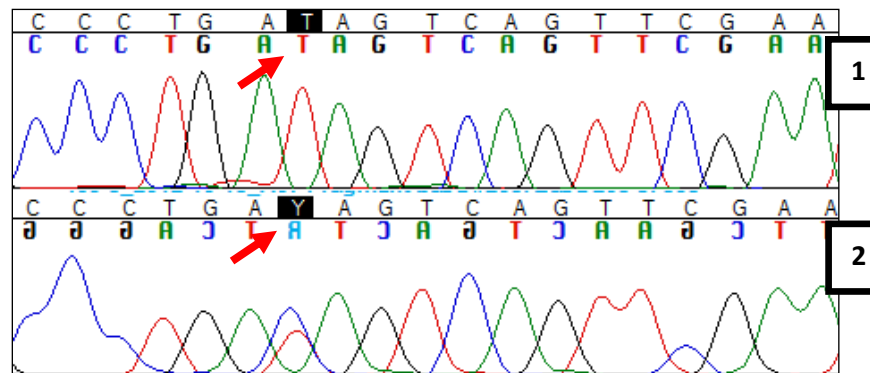
Electroferogramas parciales que presenta el SNP rs60100877. El electroferograma 1 es un control. El electroferograma 2 muestra el SNP, que se presenta de manera heterocigota.

rs 9897526.



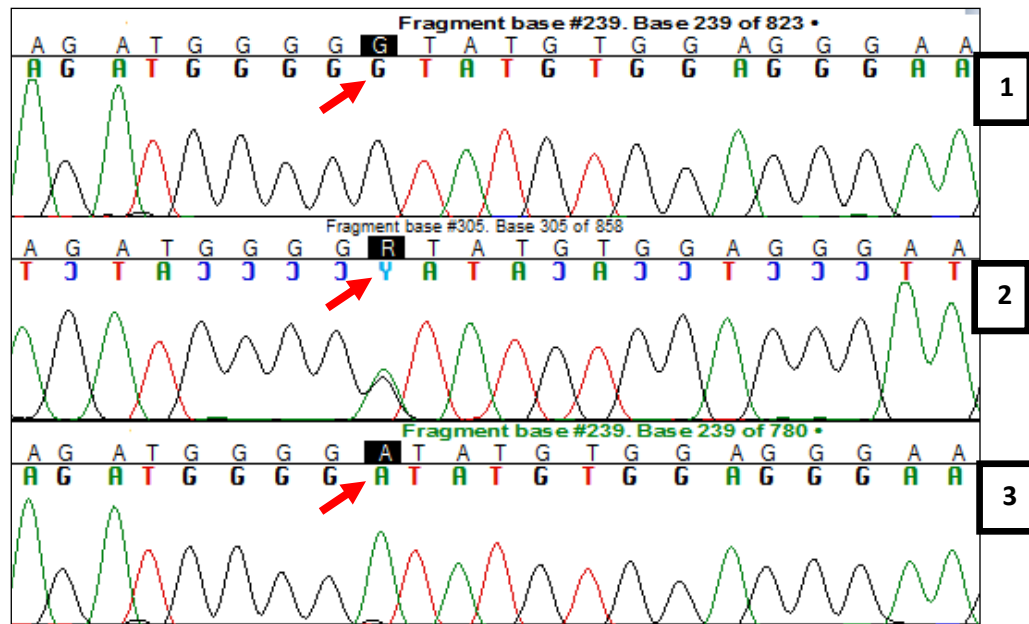
Electroferogramas parciales que presenta el SNP rs9897526. El electroferograma 1 es un control. El electroferograma 2 muestra el SNP, que se presenta de manera heterocigota.

rs 25646.



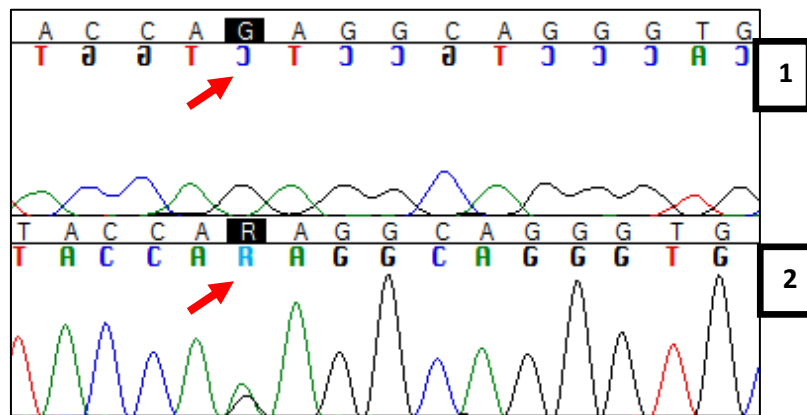
Electroferogramas parciales que presenta el SNP rs25646. El electroferograma 1 es un control. El electroferograma 2 muestra el SNP "rs25646", que se presenta de manera heterocigota.

rs 850713.



Electroferogramas parciales que presenta el SNP rs850713. El electroferograma 1 es un control. El electroferograma 2 muestra el SNP rs850713, que se presenta de manera heterocigota y en el electroferograma se presente el SNP de manera homocigota.

rs 72824736.



Electroferogramas parciales. El electroferograma 1 es un control. El electroferograma 2 muestra el SNP rs72824736 de manera heterocigota.