



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de mutaciones en el gen *TARDBP* en  
pacientes con demencia frontotemporal  
(DFT)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**OMAR HERNÁNDEZ VERGARA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Petra Yescas Gómez**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



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.

<p>1. Datos del alumno  Apellido Paterno  Apellido materno  Nombre(s)  Teléfono  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Carrera  Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno  Hernández  Vergara  Omar  58446203  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Biología  307043890</p>
<p>2. Datos del Tutor  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor  Dra.  Petra  Yescas  Gómez</p>
<p>3. Datos del sinodal 1  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1  Dra.  Rosario  Rodríguez  Arnáiz</p>
<p>4. Datos del sinodal 2  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2  Dra.  Claudia Andrea  Segal  Kischinevzky</p>
<p>5. Datos del sinodal 3  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3  M. en C.  Alfonso José  Vilchis  Peluyera</p>
<p>6. Datos del sinodal 4  Grado  Nombre(s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4  Q.  Viviana  Escobar  Sánchez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito  Título   Número de páginas  Año</p>	<p>8. Datos del trabajo escrito  Análisis de mutaciones en el gen  TARDBP en pacientes con  demencia frontotemporal (DFT)  73 p  2016</p>

EI PRESENTE TRABAJO FUE ELABORADO EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”

---

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

**ASESOR DEL TEMA**

---

OMAR HERNÁNDEZ VERGARA

**SUSTENTANTE**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi tutora, quien me brindó la oportunidad de trabajar e incursionar en este campo de conocimiento, dándome un lugar en su laboratorio y confiando en mi destreza para llevar a cabo cualquier empresa, así como por sus valiosos consejos.*

*A la Dra. Nancy Monroy, al M. en C Edgar Sandoval, a la M. en C. Elizabeth Ruiz, y a la M. en C. Lizbeth Esmeralda García Velázquez por toda la ayuda recibida para la realización de este proyecto.*

*A mis profesores, quienes me ayudaron a comprender que el objetivo siempre será saciar esa hambre de conocimiento, encontrar la respuesta a todas mis preguntas y no conformarme con una definición de libro.*

*A mis compañeros, por todo el apoyo recibido a lo largo de mi trayectoria como estudiante.*

*A mis amigos quienes lejos de desanimarme me impulsaron para alcanzar mis metas, quienes compartieron conmigo un instante de sus vidas y sacaron lo mejor de mí hasta en los momentos más difíciles.*

*A mi familia, el pilar más importante de mi vida, por su paciencia y sacrificio, sin ellos nada de esto sería posible; en especial a ti, madre, sin tu apoyo y contribución no podría haberlo logrado, tú que nunca creíste que llegaría tan lejos...*

*A ti "V", que me mantuviste en pie cuando todo iba mal, que siempre fuiste la única que se quedó hasta el final y que me enseñó a ver la luz en la oscuridad.*

*Finalmente agradezco a todo aquel, cuyo esfuerzo ha contribuido el permitirme estar aquí, siempre estaré en deuda.*

## **Dedicatoria**

*A mi familia y seres queridos.....*

*A quien me he referido como amigo.....*

*A quien ya no está conmigo....*

*-Estamos aquí para desaprender las enseñanzas de la iglesia, el estado y nuestro sistema educativo. Estamos aquí para tomar cerveza. Estamos aquí para matar la guerra. Estamos aquí para reírnos del destino y vivir tan bien nuestra vida que la muerte tiemble al recibirnos.*

*Charles Bukowski*

I.	Índice.....	1
II.	Abreviaturas.....	3
III.	Resumen.....	5
IV.	Introducción.....	7
	4.1 Concepto de demencia.....	7
	4.2 Demencia frontotemporal.....	7
	4.2.1 Epidemiología.....	8
	4.2.2 Clasificación de la DFT.....	8
	4.2.2.1 Características clínicas.....	8
	4.2.2.1.1 Demencia frontotemporal variante conductual.....	9
	4.2.2.1.2 Demencia semántica.....	9
	4.2.2.1.3 Afasia progresiva no afluyente.....	10
	4.2.2.2 Características histopatológicas.....	11
	4.2.3 Etiología y genética de la demencia frontotemporal.....	13
	4.2.3.1 <i>MAPT</i> .....	15
	4.2.3.2 <i>PGRN</i> .....	16
	4.2.3.3 <i>CHMP2B</i> .....	17
	4.2.3.4 <i>VCP</i> .....	17
	4.2.3.5 <i>C9ORF72</i> .....	18
	4.2.3.6 <i>FUS</i> .....	19
	4.2.3.7 <i>TARDBP</i> .....	20
	4.2.3.7.1 TDP-43 .....	24
V.	Antecedentes.....	25
	5.1 Funciones biológicas de TDP-43.....	25

5.2 Mutaciones en el gen <i>TARDBP</i> .....	31
5.3 Mecanismo de patogénesis propuesto.....	32
VI. Hipótesis.....	38
VII. Objetivos.....	38
7.1 Objetivo general.....	38
7.2 Objetivos particulares.....	38
VIII. Métodos.....	39
IX. Resultados .....	50
X. Análisis de resultados y discusión.....	56
XI. Conclusiones.....	61
XII. Perspectivas.....	62
XIII. Bibliografía.....	63
XIV. Apéndice.....	69
14.1 Reactivos.....	69
14.2 Materiales y equipos .....	70
XIV. Anexo.....	71

## II. Abreviaturas.

<b>3R</b>	Tres dominios repetidos de unión a microtúbulos	<b>DLFT-TDP</b>	Degeneración lobar frontotemporal con inclusiones de TDP- 43
<b>3'UTR</b>	Región 3' no traducible	<b>DLFT-U</b>	Degeneración lobar frontotemporal con inclusiones positivas para ubiquitina
<b>4R</b>	Cuatro dominios repetidos unión a microtúbulos	<b>DS</b>	Demencia semántica
<b>AD</b>	Autosómico Dominante	<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APNF</b>	Afasia progresiva no fluente	<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>ApoA- II</b>	Apolipoproteína A-II	<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>BLGR</b>	Amortiguador de lisis de glóbulos rojos	<b>ESCRT</b>	Complejo de clasificación endosomal requerido por el complejo de transporte
<b>CDK6</b>	Cinasa-6 dependiente de ciclinas	<b>FUS</b>	Proteína fusionada en sarcoma
<b>CFTR</b>	Regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística en humanos	<b>G<sub>4</sub>C<sub>2</sub></b>	GGGGCC
<b>CHMP2B</b>	Gen codificante para la proteína multivesicular	<b>g</b>	Gramos
<b>Cis</b>	Secuencia contigua al gen regulado.	<b>g</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>CTF</b>	Fragmentos del extremo carboxilo terminal.	<b>GEF</b>	Factores intercambiadores de guanósín trifosfato
<b>DENN</b>	Proteínas diferencialmente expresadas en células normales y neoplásicas.	<b>GRNs</b>	Granulinas
<b>DFT</b>	Demencia frontotemporal	<b>GTP</b>	Guanósín- trifosfato
<b>DFTc</b>	Demencia frontotemporal variante conductual	<b>GU</b>	guaninas y uracilo
<b>DLFT</b>	Degeneración lobar frontotemporal	<b>HDAC6</b>	Desacetilasa de histonas 6
<b>DLFT- FUS</b>	Degeneración lobar frontotemporal con inclusiones de FUS	<b>HGNC</b>	HUGO <i>Gene Nomenclature Committee</i>
<b>DLFT-TAU</b>	Degeneración lobar frontotemporal con inclusiones de TAU	<b>hnRNPs</b>	Familia heterogénea de ribonucleoproteínas
		<b>HSF</b>	<i>Human Splicing Finder</i>
		<b>INNMVS</b>	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

<b>KDa</b>	Kilodalton	<b>Q/N</b>	Glutamina y asparagina
<b>LTR</b>	Región terminal larga de repetidos	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>M</b>	Molaridad	<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MAPT</b>	Gen de la proteína TAU asociada a microtúbulos	<b>RNP2</b>	Secuencia de hexapéptido consenso
<b>mg</b>	Miligramos	<b>RNP1</b>	Secuencia octapéptido consenso
<b>MIR</b>	Región de interacción con microtúbulos	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>MIT</b>	Región de interacción con microtúbulos de transporte	<b>RRM 1</b>	Motivo 1 de reconocimiento de RNA
<b>mL</b>	Mililitros	<b>RRM 2</b>	Motivo 2 de reconocimiento de RNA
<b>miRNA</b>	MicroRNA	<b>ABS</b>	Amortiguador de boratos y sodio
<b>mM</b>	Milimolar	<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>MP</b>	Marcador de peso molecular	<b>SE2</b>	Región promotora de <i>splicing 2</i>
<b>MTs</b>	Microtúbulos	<b>SGs</b>	Gránulos de estrés
<b>µL</b>	Microlitros	<b>Sp</b>	<i>Splicing</i>
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio	<b>SpA</b>	<i>Splicing</i> alternativo
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	<b>TAR</b>	Región de respuesta a la tras- activación
<b>NES</b>	Señal de exportación nuclear	<b>TARDBP</b>	Gen de la proteína TAR de unión a DNA
<b>NFL</b>	Neurofilamentos de bajo peso molecular	<b>TBP</b>	Proteínas de unión a la caja TATA
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear	<b>TDP-43</b>	Proteína TAR- 43 de unión a DNA
<b>NMD</b>	Mediado por decaimiento sin sentido	<b>UPS</b>	Sistema de ubiquitinación del proteasoma
<b>pb</b>	Pares de bases	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<b>V</b>	Volts
<b>PGRN</b>	Gen de la Progranulina	<b>VCP</b>	Gen que codifica para lo proteína que contiene valosina
<b>PGRNs</b>	Progranulinas		
<b>DNA PolIII</b>	DNA Polimerasa II		

### III. Resumen

En los últimos años la esperanza de vida de la población mexicana se ha incrementado considerablemente, debido en parte al desarrollo de nuevos tratamientos médicos y farmacológicos, ocasionando un incremento de la población adulta en el país. Actualmente en un país como el nuestro, los padecimientos como la demencia frontotemporal se ven incrementados al aumentar la proporción de adultos mayores. Esto trae como consecuencia que las demencias sean consideradas hoy en día como un problema de salud pública.

La demencia frontotemporal (DFT) es un síndrome clínico y genéticamente heterogéneo que se caracteriza por cambios progresivos en la conducta, personalidad y/o lenguaje, el cual se presenta con un inicio temprano, es decir antes de los 65 años. En esta enfermedad, el 70% de los casos son esporádicos, mientras que el 30% restante corresponde a casos con una historia familiar positiva, presentando un patrón de herencia autosómico dominante (AD).

Hasta el momento se han descrito mutaciones y/o polimorfismos en siete *loci* que podrían explicar estas formas familiares, entre los cuales se encuentra *TARDBP*. En conjunto, estas mutaciones explican un porcentaje significativo del número de casos familiares de DFT. Sin embargo, es difícil determinar el número total de casos con patrón de herencia AD debido a que en muchas ocasiones existe desconocimiento de la historia familiar, así como a la gran variabilidad de los síntomas clínicos que hacen difícil el diagnóstico clínico, siendo necesaria la aplicación de pruebas moleculares que confirmen la sospecha clínica.

El objetivo del presente estudio fue la búsqueda de mutaciones y/o polimorfismos en el gen *TARDBP* mediante secuenciación directa tipo Sanger; se analizaron 30 pacientes con diagnóstico probable de demencia frontotemporal que cumplen criterios clínicos de DFT y que fueron evaluados por el especialista en demencias y enviados al departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suárez”. Adicionalmente se incluyeron en este estudio 40 controles de adultos sanos obtenidos del banco de DNA del departamento.

El 80% de los casos estudiados presentaron la variante intrónica c.714+69\_714+70InsG en el gen *TARDBP* en estado homocigoto, mientras que el 20% restante presentó la misma variante en estado heterocigoto. Encontrando resultados similares con el grupo control de individuos sanos. No se identificaron mutaciones, ni otros polimorfismos en los pacientes con DFT

## **IV. Introducción**

### **4.1 Concepto de demencia**

Los primeros registros sobre el reconocimiento del deterioro cognitivo como una afección se remontan al periodo greco-romano. En un principio esto se atribuyó al proceso normal de envejecimiento, resultado de un desequilibrio en el balance corporal, llegando a proponer que un fallo en las capacidades mentales es inherente a la edad adulta [1,2].

Esta idea permaneció durante mucho tiempo como la mejor explicación a los cambios observados en las personas de edad avanzada.

Siglos después, los avances en el conocimiento sobre las afecciones mentales, llevó a la creación y establecimiento de nuevas explicaciones, así como a mejores clasificaciones de los trastornos cognitivos reconocidos hasta la fecha.

No fue sino hasta el siglo XIX que la demencia fue descrita como una condición adquirida, en la que se muestra un déficit o pérdida de las capacidades intelectuales y que no es exclusiva de los estadios últimos de la vida [1,2].

En la actualidad, el término demencia se utiliza para denotar un estado de disfunción progresiva de la corteza cerebral, que produce un decaimiento intelectual, así como a la inhabilidad en la asociación de ideas, en el juicio, en la toma de decisiones y el razonamiento, lo cual conduce a un cambio conductual y emocional que interfiere de manera significativa en las relaciones interpersonales y en el desempeño de las funciones laborales [3].

### **4.2 Demencia frontotemporal**

La demencia frontotemporal (DFT) es un término que se aplica a un tipo de demencia progresiva cuyo desarrollo conlleva a cambios en el comportamiento y/o disfunción del lenguaje. Se considera un desorden neurodegenerativo de causa genética y patológicamente heterogéneo, en el cual los lóbulos frontales y temporales degeneran de manera preferencial; se considera que es la segunda

causa más común de demencia en el adulto mayor después, de la enfermedad de Alzheimer (EA). El desarrollo de este padecimiento es temprano, antes de los 65 años, más temprano incluso que la enfermedad de Alzheimer. Un alto porcentaje de los casos de DFT presentan un componente genético y cerca del 30% de las personas afectadas con este padecimiento tienen una historia familiar positiva, de las cuales sólo en un 10 al 20% se confirma un patrón de herencia autosómica dominante. [4]

#### **4.2.1 Epidemiología**

La incidencia de la enfermedad en grupos de edad de entre 45 a 65 años es de 10 a 20 por cada 100,000 individuos. La enfermedad típicamente se presenta al inicio de la sexta década de vida, sin embargo la edad de inicio puede variar llegando a aparecer entre la tercera y novena década. Todos estos datos epidemiológicos sugieren que la DFT es la causa más común de demencia de inicio temprano, con una incidencia y prevalencia similar a la EA [5, 6, 7].

Para la DFT se ha estimado una media de supervivencia de 6-11 años a partir del inicio de los síntomas y de 3-4 años a partir del diagnóstico, debido en gran medida al rápido deterioro cognitivo y funcional [8,9].

#### **4.2.2 Clasificación de la DFT**

##### **4.2.2.1 Características clínicas**

Fenotípicamente se pueden distinguir tres variantes principales de demencia frontotemporal: la variante clásica de comportamiento, que representa la forma más común (DFTc), otra de las variantes presenta afasia progresiva no afluyente (APNF) y la demencia semántica (DS). Estos fenotipos están asociados con la neurodegeneración de áreas específicas en el cerebro. En la DFTc se presenta una degeneración predominante de la porción prefrontal, mientras que en la DS se

ven afectados principalmente los lóbulos anterior y temporal; por último en la APNF se observa atrofia en la zona perisilviana izquierda [10,11].

La distribución de acuerdo al género en la DFT aparentemente varía dependiendo del síndrome clínico; los estudios reportan una mayor incidencia en los hombres a padecer DS, así como DFTc, mientras que en el caso de las mujeres, tienden a padecer en mayor proporción APNF [12, 13].

#### **4.2.2.1.1 Demencia frontotemporal variante conductual (DFTc)**

Los pacientes con esta variante clínica presentan un cambio marcado en la personalidad y la conducta, en ocasiones pueden presentar una mezcla de apatía y desinhibición. La apatía se caracteriza por una pérdida del interés en los asuntos y responsabilidades personales, aislamiento social y conforme la enfermedad avanza, pérdida de la conciencia de la higiene personal, así como la pérdida del control de esfínteres; mientras que la desinhibición se manifiesta mediante múltiples comportamientos socialmente inapropiados, como por ejemplo la búsqueda de la confrontación y el uso de palabras hirientes, así como un comportamiento francamente sociópata.

En estos pacientes el síntoma cognitivo más común es un juicio pobre, falta de atención y distracción, así como errores perseverantes que son características de utilidad al diferenciar la variante DFTc de otros desórdenes [7,14,15,16].

#### **4.2.2.1.2 Demencia semántica (DS)**

En ocasiones referida como variante temporal, se caracteriza por presentar afasia fluente y anómica así como cambios conductuales; esta variante puede presentarse con degeneración asimétrica de los lóbulos antero-temporales. Los pacientes con atrofia del lado izquierdo presentan inicialmente una pérdida progresiva del conocimiento semántico sobre las palabras, los objetos y

conceptos; con el tiempo se extiende más allá del lenguaje con lo que los pacientes desarrollan características de una agnosia multimodal.

Los pacientes con una atrofia predominante de la región antero-temporal derecha presentan síndromes conductuales que se asemejan a los presentes en la DFTc; los pacientes desarrollan un embotamiento emocional y un afecto bizarro, con una marcada pérdida de la empatía y el interés por los demás, su comportamiento social es descrito como torpe, con falta de tacto e impermeable a las señales sociales. Son inflexibles, comúnmente esto se manifiesta con calendarios y rutinas estrictas. La prosopagnosia y la agnosia asociativa se enfatizan como criterios diagnósticos comunes. Comparados con los pacientes que presentan DFTc, los pacientes con degeneración predominante del lado derecho tienden a ser más rígidos, ya que presentan diferentes tipos de compulsiones y desórdenes alimenticios, así como síntomas constitucionales como desórdenes del sueño, pérdida de peso y disfunción sexual.

#### **4.2.2.1.3 Afasia progresiva no fluente (APNF)**

La APNF se presenta como una afección progresiva del lenguaje, asociada a una atrofia de la zona perisilviana. Los pacientes muestran una capacidad disminuida del habla así como discapacidad en la comprensión de la gramática (agramatismo). Las pruebas neuropsicométricas pueden mostrar un leve déficit de memoria y de las funciones ejecutivas con episodios de prevalencia de la memoria y las funciones visuoespaciales, adicionalmente pueden ocurrir cambios conductuales, aunque son menos frecuentes y severos en comparación con los que ocurren en la DFTc. Anatómicamente la APNF se asocia con atrofia, hipermetabolismo e hipoperfusión del opérculo frontal izquierdo, de las áreas premotoras y suplementarias así como de la ínsula anterior.

En la Tabla 1 se muestran las principales características clínicas de cada una de estas variantes.

**Tabla 1. Categorías diagnósticas de DFT.**

		<b>Área cerebral afectada</b>	<b>Principales características clínicas</b>
<b>DFT</b>	<b>DFTc</b>	Porción prefrontal	Desinhibición, apatía, falta de conexión, hiperoralidad, comportamiento estereotípico y disfunción generalizada
	<b>APNF</b>	Zona perisilviana izquierda	Dificultad al hablar, agramatismo, relativa falta de comprensión
	<b>DS</b>	Lóbulos anterior y temporal	Déficit de comprensión, error al nombrar, habla fluida

#### **4.2.2.2 Características histopatológicas**

En la autopsia, los pacientes con DFT muestran una grave atrofia de los lóbulos frontal y anterior temporal, de ahí que se reasigna al padecimiento el nombre de degeneración lobar frontotemporal (DLFT). La mayor parte de los casos de DFT pueden ser subclasificados dentro de dos grandes categorías, las cuales están basadas en la presencia o ausencia de cuerpos inclusivos específicos; por un lado se encuentra la degeneración lobar frontotemporal con inclusiones de la proteína tau (DLFT-TAU) y por otro la degeneración lobar frontotemporal con inclusiones negativas para tau, pero positivas para ubiquitina y TDP-43 (DLFT-TDP).

##### **a) DLFT-TAU**

Los casos de DFT relacionados con la proteína tau pueden ser clasificados con base en las características morfológicas y composición bioquímica de las inclusiones positivas para tau. La enfermedad de Pick caracteriza a las tautopatías de DFT, la cual se distingue por la presencia de inclusiones de Pick, que se observan como inclusiones redondas u ovaladas y se encuentran en el citoplasma de las neuronas, de manera preferencial de la neocorteza frontal y temporal. Fue en 1986, cuando se observó que las inclusiones de la enfermedad de Pick son inmunorreactivas a la proteína tau hiperfosforilada; una proteína codificada por el

gen *MAPT*, asociada a microtúbulos, la cual estabiliza y promueve el ensamblaje de los mismos. Los pacientes con mutaciones en el gen *MAPT* pueden presentar las características patológicas de la enfermedad de Pick. Alrededor del 40% de los pacientes con DFT muestran inclusiones de la proteína tau [7,17, 18 19].

## **b) DLFT-TDP**

La patología de DLFT negativa para tau ha sido más difícil de definir, como resultado de ello se ha descrito en la literatura usando varios nombres. La impresión inicial fue que la mayoría de los casos de DLFT negativos para tau no se encontraban asociados con inclusiones proteicas distinguibles, siendo descrita como una demencia carente de una histopatología distintiva (DLFTH). Con los avances en la inmunohistoquímica, se pudo confirmar que una gran mayoría de los casos de DLFT mostraban inmunorreactividad a ubiquitina, acuñando así el término de DLFT con inclusiones positivas a ubiquitina (DLFT-U). En 2006 fue identificada la proteína de fijación a DNA, TAR 43 (TDP-43) como el componente principal de las inclusiones en la mayoría de los casos de DLFT-U, por lo cual se utiliza el término DLFT- TDP. TDP-43 es una proteína altamente conservada, que está involucrada en la transcripción del DNA y en el *splicing*. Se considera una proteína predominantemente nuclear, pero bajo condiciones patológicas, TDP-43 es desplazada del núcleo celular al citoplasma, es hiperfosforilada, ubiquitinada y cortada para producir fragmentos carboxilo terminal. Estas inclusiones se encuentran en casos familiares asociados a mutaciones en los genes *PGRN* y *VCP*. Este tipo de inclusiones se encuentran de manera preferencial en el giro dentado del hipocampo y en la segunda capa de neuronas en la corteza frontotemporal. Se calcula que aproximadamente el 50% de los pacientes con DFT presentan inclusiones de TDP-43 [7,18,20,21].

### **c) DLFT-FUS**

Del 5 al 20% de los casos de DLFT- U son negativos para la presencia de inclusiones de TDP-43, pero recientemente se ha encontrado que en muchos de estos casos las inclusiones están constituidas por la proteína fusionada de sarcoma (FUS). FUS es una proteína ubiquitinada de unión a DNA y RNA que regula la expresión génica y la translocación de los cromosomas. Las inclusiones de FUS son similares en morfología y distribución a las inclusiones de TDP-43, aunque hasta el momento la presencia de TDP-43 y FUS parece ser mutuamente excluyente [7,18,22].

### **4.2.3 Etiología y genética de la demencia frontotemporal**

Un alto porcentaje de los casos de DFT tienen una base genética, cerca del 50% de los pacientes presentan una historia familiar positiva, con un patrón de herencia autosómico dominante (AD).

A la fecha se han identificado mutaciones en 6 genes así como la expansión de un hexanucleótido repetido (GGGGCC) en el cromosoma 9, que pueden estar implicados de manera directa en el desarrollo de la DFT. En la tabla 2 se muestran los genes implicados, identificados hasta el momento.

**Tabla 2. Principales *loci* implicados en el desarrollo de DFT**

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b><i>Loci</i></b>	<b># de mutaciones reportadas</b>	<b>Tipo de mutación</b>
<b><i>MAPT</i></b>	Proteína TAU asociada a microtúbulos	17q21.1	72	Delección, sentido erróneo y sitio de <i>splicing</i>
<b><i>PGRN</i></b>	Progranulina	17q21.3	148	Sin sentido, de sentido erróneo, delección, corrimiento del marco de lectura, sitio de <i>splicing</i>
<b><i>CHMP2B</i></b>	Proteína multivesicular 2B	3p11.2	11	Sin sentido y sentido erróneo
<b><i>VCP</i></b>	Proteína contenedora de valosina	9p13.3	18	Sentido erróneo
<b><i>FUS</i></b>	Proteína fusionada de sarcoma	16p11.2	40	Sentido erróneo, sin sentido y delección.
<b><i>TARDBP</i></b>	TDP-43	1p36.2	49	Sentido erróneo, sin sentido y delección.
<b><i>C9ORF72</i></b>	Marco abierto de lectura 72 en cromosoma 9		1	Expansión de hexanucleótido

Tabla elaborada a partir de lo reportado en las bases de datos *e!ENSEMBLE*, *NCBI* y *MOLGEN*

#### 4.2.3.1 MAPT

El gen *MAPT* codifica para la proteína Tau de asociación a microtúbulos, se localiza en la región cromosómica 17q21.1 y está compuesto de un total de 16 exones de los cuales tres (exones 2, 3 y 10) sufren *splicing* alternativo y tres son raramente transcritos (exones 4a, 6 y 8) llevando a la generación de las 6 isoformas encontradas en el cerebro, tres contienen tres dominios de unión a microtúbulos (3R) mientras la mitad de las isoformas restantes contienen cuatro dominios de unión a microtúbulos 4R, que depende exclusivamente de la inclusión del exón 10. En el cerebro adulto normal, la proporción de repetidos 3R/4R es alrededor de 1, por lo tanto, al presentarse una patología asociada a la proteína tau, que ocasiona un desbalance en esta proporción, se genera una incapacidad de la proteína tau para funcionar de manera correcta y se provoca la formación de inclusiones.

La función primaria de Tau es la de unirse y estabilizar a los microtúbulos (MTs), asimismo contribuye al mantenimiento de la forma celular y al tránsito de moléculas a lo largo del axón; adicionalmente Tau parece tener un papel en la polaridad neuronal y la transducción de señales. Tau es una de las proteínas neuronales más representativas asociadas a los microtúbulos; no sólo regula la estructura de los mismos, sino que a partir del dominio de proyección N-terminal, media la interacción con elementos del citoesqueleto y con otros componentes de la membrana plasmática neuronal. A la fecha se tienen identificadas 72 variantes, la mayoría de ellas localizadas a nivel de los dominios de unión a MTs, las cuales causan una disminución de la capacidad de Tau para unirse a los MTs, por lo que se ven afectadas la plasticidad y arquitectura neuronal, así como el transporte axonal que ocurre a través de los MTs; por lo que se propone una auto-agregación que lleva a la formación de inclusiones anormales en neuronas y células gliales. Por último, se tiene conocimiento de que las mutaciones intrónicas afectan el proceso normal de *splicing* de ciertos exones, lo que da como resultado un cambio en la proporción de las isoformas 3R/4R, lo cual se ha relacionado con los

procesos neurodegenerativos. A las mutaciones en este gen se pueden atribuir aproximadamente un 20% de los casos familiares de DFT [23, 24, 25, 26].

#### **4.2.3.2 PGRN**

El gen *PGRN* se localiza en la región cromosómica 17q21.32 y consiste de un total de 13 exones de los cuales el primero es no codificante. *PGRN* codifica para la precursora de las Granulinas (GRNs) proteína de 593 residuos de aminoácidos.

Las Progranulinas (PGRNs) se expresan de modo ubicuitinado en diferentes tejidos, especialmente en tejidos con actividad mitótica como lo es el tejido epitelial y el tejido hematopoyético. En el sistema nervioso central, las PGRNs se encuentran en la corteza cerebral, en el cerebelo y en el hipocampo; este gen es regulado por la activación de las células de la microglía. Está involucrado en diferentes procesos biológicos, como la progresión del ciclo celular, la regulación del crecimiento celular, la recuperación de heridas y procesos inflamatorios. Asimismo, PGRN activa muchas cascadas de señalización dependientes de cinasas (controlando el ciclo celular y motilidad), estimula la inducción del factor de crecimiento vascular endotelial y se propone que tiene un papel en el desarrollo cerebral.

Hasta el momento, han sido reportadas 148 variantes, de las cuales 69 parecen ejercer efectos patogénicos; algunas de estas mutaciones, en específico variaciones sin sentido, intrónicas y que provocan un corrimiento del marco de lectura, ocasionan una haploinsuficiencia de PGRN, debido al decaimiento del mRNA o mediante la degradación nuclear del transcrito, contribuyendo de esta manera a un decremento en la secreción de PGRNs. Mutaciones o cambios en este gen explica del 10 al 20% de los casos de DFT con un patrón de herencia autosómico dominante [23, 24, 25, 26].

#### **4.2.3.3 CHMP2B**

El gen *CHMP2B* que codifica para la proteína multivesicular 2B, con una longitud de 213 residuos de aminoácidos, se localiza en la región cromosómica 3p11.2 y consta de 6 exones codificantes. La proteína resultante se caracteriza por un dominio amino terminal enroscado, así como una región de interacción con microtúbulos de transporte (MIT) y una región de interacción con microtúbulos (MIR) en el extremo carboxilo.

*CHMP2B* es parte del complejo de clasificación endosomal requerido por el complejo de transporte III (ESCRT), y está involucrado en el direccionamiento y tránsito de receptores de superficie o proteínas dentro de las vesículas intraluminares, para la degradación lisosomal y unión a la proteína Vps4 responsable de la disociación de los componentes del ESCRT. Hasta la fecha se han descrito 11 variantes, de las cuales cuatro parecen estar relacionadas a la patología. Estas mutaciones han sido asociadas con un agrandamiento vacuolar en neuronas corticales debido a un mal funcionamiento del complejo endosoma-lisosoma, así como con un deterioro del proceso de autofagia, llevando a un fenotipo citoplásmico aberrante y a un descontrol en el tránsito endosomal. Las mutaciones en este gen son responsables de al menos el 1% de los casos de DFT [23, 24, 25, 26].

#### **4.2.3.4 VCP**

El gen *VCP* codifica para la proteína contenedora de valosina con una longitud de 806 residuos de aminoácidos; se encuentra localizado en la región cromosómica 9p13.3 y consta de 17 exones codificantes. *VCP* está involucrada en varios procesos celulares como la regulación del ciclo celular, el ensamblaje post-mitótico del aparato de Golgi, supresión de la apoptosis, respuesta al daño en el DNA y la degradación de proteínas a través del sistema de ubiquitinación del proteosoma (UPS) y de la vía de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico. Fundamentalmente, *VCP* está involucrada en la homeostasis de proteínas, es decir, en el manteniendo del balance adecuado entre síntesis y degradación de

proteínas y se expresa en la mayoría de los tejidos de mamíferos. Se tienen identificadas 18 variantes, de las cuales 17 parecen ejercer un efecto deletéreo. Por el momento, la mejor hipótesis asume que las mutaciones en este gen generan un mal ensamblaje y función de las estructuras autofágicas, afectando así la degradación de proteínas, lo que contribuye a la formación de inclusiones miopáticas, como las observadas en la enfermedad ósea de Paget. Las variantes en este gen explican al menos un 1% de los casos familiares de DFT [23, 24, 25, 26].

#### **4.2.3.5 C9ORF72**

La expansión del hexanucleótido repetido GGGGCC ( $G_4C_2$ ) que ocurre en la región cromosómica 9p21 no codificante y se identificó como resultado del análisis exhaustivo en la búsqueda posicional de genes candidatos tanto en casos de DFT como de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En la población sana, el tamaño de los repetidos ( $G_4C_2$ ) $_n$  abarca un rango que va desde 3 a 25 unidades, mientras que en pacientes ocurre una expansión de al menos 60 unidades, existiendo casos de portadores con alelos expandidos de hasta 700 y 1600 unidades. *C9orf72* es un gen altamente conservado, evolutivamente hablando y aún no se ha identificado el producto, aunque se piensa que la proteína resultante se asemeja estructuralmente a las proteínas expresadas diferencialmente en condiciones normales vs neoplásicas (DENN). Las proteínas DENN son factores intercambiadores de guanósín trifosfato (GTP), GEF por sus siglas en inglés, que activan a las Rab GTPasas, necesarias en el tránsito a través de la membrana así como en los procesos de endocitosis y autofagia.

La expansión de la repetición  $G_4C_2$  resulta en la pérdida de la expresión de uno de los transcritos alternativos del gen; Adicionalmente se ha propuesto que la acumulación de transcritos favorecida por la expansión de repeticiones lleva a la formación de focos de RNA nucleares, sin embargo aún no se conoce del todo el mecanismo por el cual esto contribuye al progreso de la neurodegeneración. Los alelos con más de 30 repetidos están enriquecidos con marcas epigenéticas del promotor (de la histona 3), lo que promueve la formación de heterocromatina,

reduciendo la tasa de transcripción, sugiriendo que la haploinsuficiencia puede contribuir a la patología. Hasta el momento se sabe que esta alteración está implicada en aproximadamente el 25% de los casos de DFT [23, 24, 25, 26, 27].

#### **4.2.3.6 FUS**

El gen *FUS* se localiza en la región cromosómica 16p11.2, se compone de un total de 15 exones y codifica para una proteína con una longitud de 526 residuos de aminoácidos; dicha proteína tiene similitud estructural con la familia heterogénea de ribonucleoproteínas (hnRNPs) que están involucradas en múltiples pasos del procesamiento del RNA, incluyendo la transcripción, el proceso de *splicing*, el transporte y la traducción. Se tiene evidencia de que *FUS* es necesario en los mecanismos de reparación de rupturas de doble hebra en el DNA. En modelos de ratón *knockout* la eliminación de *FUS* ocasiona un alto nivel de inestabilidad cromosómica, esterilidad en los machos debido a defectos en la formación de bivalentes de los autosomas y un incremento en la sensibilidad a la radiación ionizante [28].

Hasta el momento se han identificado 40 variaciones para este gen, la mayoría de ellas reportadas en casos familiares de ELA, aunque también pueden encontrarse en casos esporádicos y en pacientes con DFT. Por el momento se desconocen los efectos que tienen las variaciones genéticas observadas sobre la función normal de esta proteína y de su contribución a la patogénesis de las proteinopatías, sin embargo, sí existe evidencia que implica a *FUS* en los procesos de neurodegeneración a través de los errores en múltiples pasos del procesamiento del RNA. Se considera que este gen se encuentra involucrado en menos del 1% de los casos familiares de DFT [26, 28].

#### 4.2.3.7 *TARDBP*

El gen *TARDBP* codifica para la proteína de respuesta a trans-activación (TAR) de unión a DNA con un peso de 43 kDa y una longitud de 414 aminoácidos (TDP-43); se encuentra ubicado en la región cromosómica 1p36.22 en el ser humano y comprende un total de 12.8 kpb. Está conformado por 4 intrones y 6 exones, de los cuales sólo el primero es no codificante como se muestra en la figura 1. Los exones restantes pueden estar sujetos a un proceso de *splicing* alternativo generando una amplia variedad de mRNA, los cuales a su vez pueden ser expresados dando origen a las 11 isoformas proteicas que se conocen hasta el momento [28]. Sin embargo la expresión de la forma completa de TDP-43 es generalmente la única isoforma detectada en tejido y líneas celulares humanas. Recientemente han sido identificadas 2 isoformas adicionales en tejido cerebral y en médula espinal humana. Estas isoformas varían de la forma completa de TDP-43 en la ausencia de algunos nucleótidos o la falta de exones completos, siendo también motivo de discrepancia el punto de inicio de la traducción, lo que genera nuevas isoformas con pesos que van desde 25 a 35 kDa [28, 29].

Debido a la identificación de los múltiples transcritos, se cuestionó si todos eran codificados por un solo gen, abriendo la posibilidad de que fueran originados por la expresión de diferentes genes. Posteriormente, un análisis minucioso de las bases de datos llevó a la identificación de secuencias homólogas a las de TDP-43 carentes de intrones y regiones reguladoras en los cromosomas 2, 6, 8, 13 y 20, como se puede observar en la figura 2; en la actualidad se piensa que éstas corresponden a pseudogenes originados por eventos de retrotransposición [29].

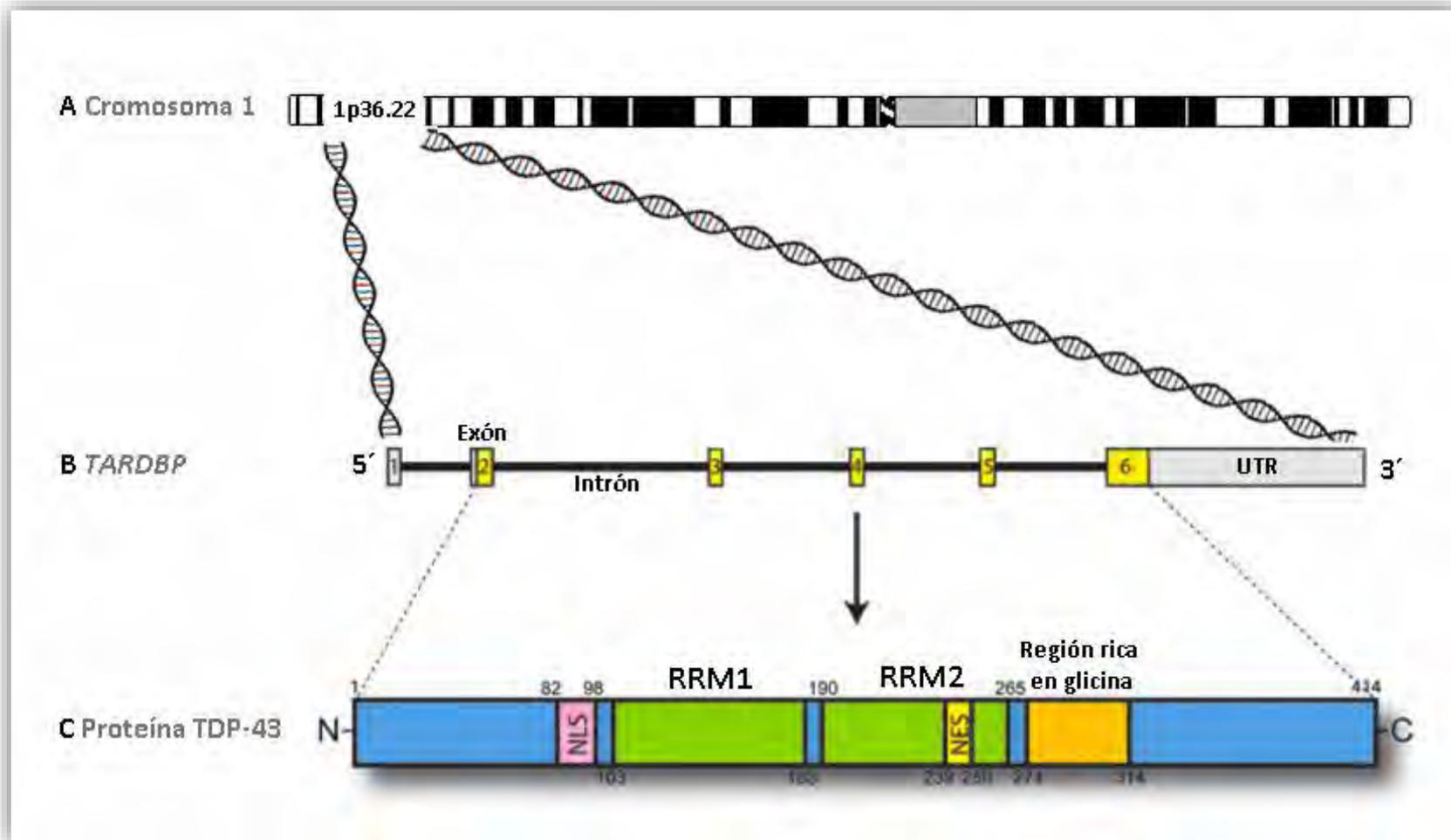


Figura 1. Representación esquemática del *loci* 1p36.22 y conformación del gen *TARDBP*. Se muestra un esquema de la localización cromosómica del gen *TARDBP* así como una representación modular de los exones que lo componen, adicionalmente se puede observar un esquema de los dominios alberga la proteína para la cual codifica el gen. A) Ideograma del cromosoma 1 en el ser humano, se muestra el *loci* 1p36.22, B) representación esquemática modular del gen *TARDBP*, C) esquema de los dominios que constituyen a la proteína TDP-43, se muestran la señal de localización nuclear (NLS), la señal de exportación nuclear (NES), Las regiones de reconocimiento de RNA (RRM1 y RRM2), así como la región rica en glicina

TDP-43 se identificó por primera vez en el año de 1995 como una proteína humana ubicuitinada de 43 kDa, altamente conservada en términos evolutivos, capaz de unirse a la región terminal de repetidos largos (LTR por sus siglas en inglés) de DNA en respuesta a transactivación (TAR) del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1). Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraron que TDP-43 es capaz de reprimir la actividad del promotor de LTR en el VIH1, probablemente a través de la unión con la porción rica en pirimidinas en la región TAR.

TDP-43 fue identificada durante la búsqueda de proteínas de unión con la región de contacto entre el intrón 8 y el exón 9 del regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística en humanos (CFTR), en donde se ha propuesto que podría estar regulando el proceso de *splicing* alternativo del exón 9 en el transcrito de CFTR. Adicionalmente TDP-43 se une con elementos o regiones del intrón 8 cerca de la unión con el exón 9, en donde se propone que a través de esta unión, TDP-43 promueve la eliminación del exón 9 durante el *splicing* de CFTR. Debido a estos hallazgos, a TDP-43 se le atribuye una función dual, como represor transcripcional y como regulador del *splicing* alternativo [23, 25, 26 29, 30].

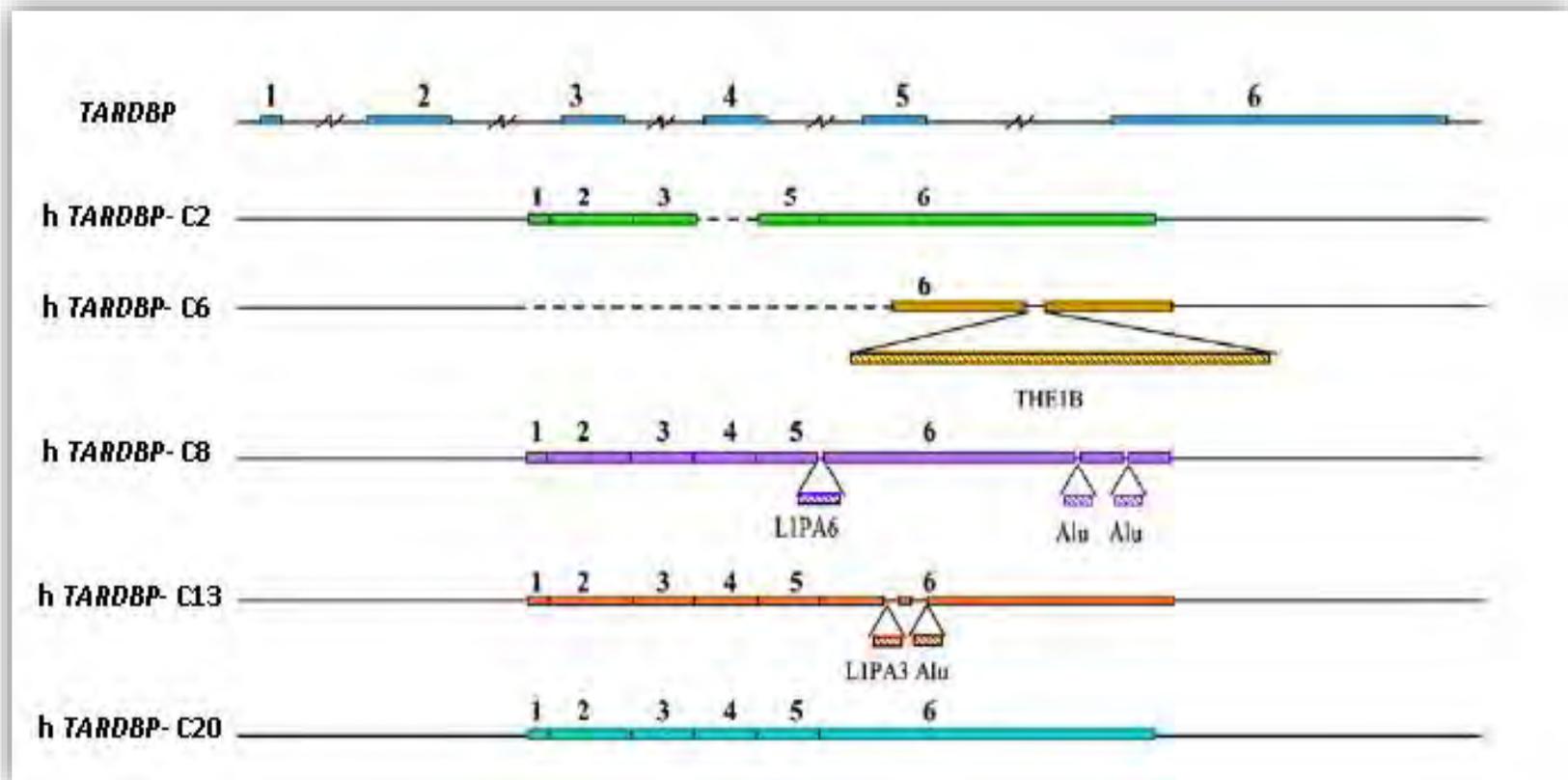
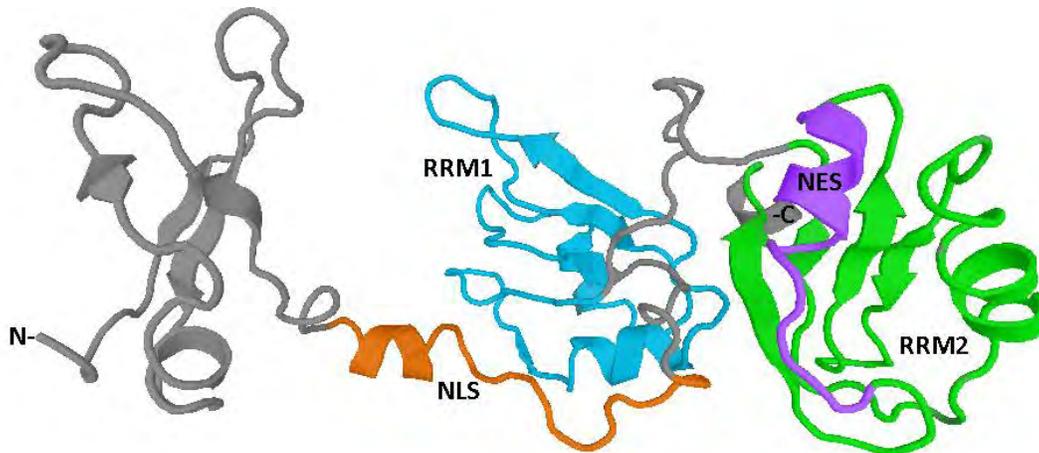


Figura 2. Representación esquemática de los pseudogenes h *TARDBP*-C2, C6, C8, C13 Y C20. Se muestra la representación esquemática de los cinco pseudogenes de *TARDBP* identificados hasta el momento en los diferentes cromosomas humanos, en la parte superior se observa la organización del gen *TARDBP* en el cromosoma 1, y en orden descendente los pseudogenes en los cromosomas 2, 6, 8, 13 y 20. Tomada y modificada de Wang H. et al. (2003) [29].

#### 4.2.3.7.1 TDP-43



**Figura 3. Modelo de la proteína TDP-43. Se muestra la estructura en 3D, modelada por homología a partir de la secuencia de aminoácidos con ayuda del programa bioinformático SWISS- MODEL; se puede la presencia de las regiones de reconocimiento de RNA 1 y 2 (RRM1 y RRM2), así como la señal bipartita de localización nuclear (NLS) y exportación nuclear (NES).**

La estructura primaria de aminoácidos de TDP-43 tiene similitud con los miembros de la familia de ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNP). TDP-43 posee dos motivos de reconocimiento a RNA (RRM) altamente conservados, los cuales se piensa están involucrados en la unión con DNA y RNA, así como en la interacción proteína-proteína, figura 1. Los motivos RRM de la proteína tienen dos segmentos conservados: una secuencia de hexapéptido (RNP2) localizada cerca del extremo amino terminal del dominio y una secuencia consenso de octapéptido (RNP1); ambas regiones pertenecientes a TDP-43 poseen una alta identidad entre diferentes organismos incluyendo el humano, el ratón, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* [28, 29, 31].

La función de la región N-terminal aún no está del todo caracterizada, sin embargo se sabe que es necesaria para llevar a cabo la regulación del *splicing* alternativo en la liberación del exón 9 de CFTR. Se cree que TDP-43 es capaz de formar

homodímeros dentro de las células, proceso que es promovido por la región N-terminal. La región rica en glicina en el extremo C-terminal está involucrada en la interacción de TDP-43 con otras proteínas, tales como hnRNP A1 y hnRNP A2/B1. Similar a otras hnRNPs, TDP-43 tiene la capacidad de autorregular sus niveles de expresión a través de un proceso de retroalimentación negativa, el cual requiere de esta región rica en glicina. Asimismo el extremo C-terminal influye en la solubilidad y controla la localización celular de TDP-43; esto se ha propuesto debido a que una delección de esta sección ocasiona un decremento en la movilidad de TDP-43 entre el citoplasma y el núcleo [28, 29, 30].

TDP-43 es una proteína predominantemente nuclear pero puede translocarse hacia el citoplasma de modo dependiente de la transcripción, debido a que contiene una señal bipartita específica de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear rica en leucina (NES); los diferentes dominios se muestran en la figura 3 y 4. Por último, en TDP-43 están presentes numerosos sitios potenciales de fosforilación, entre los que se encuentran 41 residuos de serina, 15 de treonina, y 8 residuos de tirosina, así como motivos de reconocimiento de caspasa-3, lo que predice la escisión de los fragmentos C-terminal, con pesos respectivos de 42, 35 ó 25 kDa [28].

## **V. Antecedentes**

### **5.1 Funciones biológicas de TDP-43.**

Como se mencionó anteriormente, algunos de los procesos en los cuales TDP-43 parece tener un papel crucial son necesarios para el correcto funcionamiento de la célula, lo que ha llevado a generar hipótesis acerca del posible mecanismo que lleva al desarrollo de la patología; a continuación se hablará de manera más específica sobre las funciones biológicas de TDP- 43.

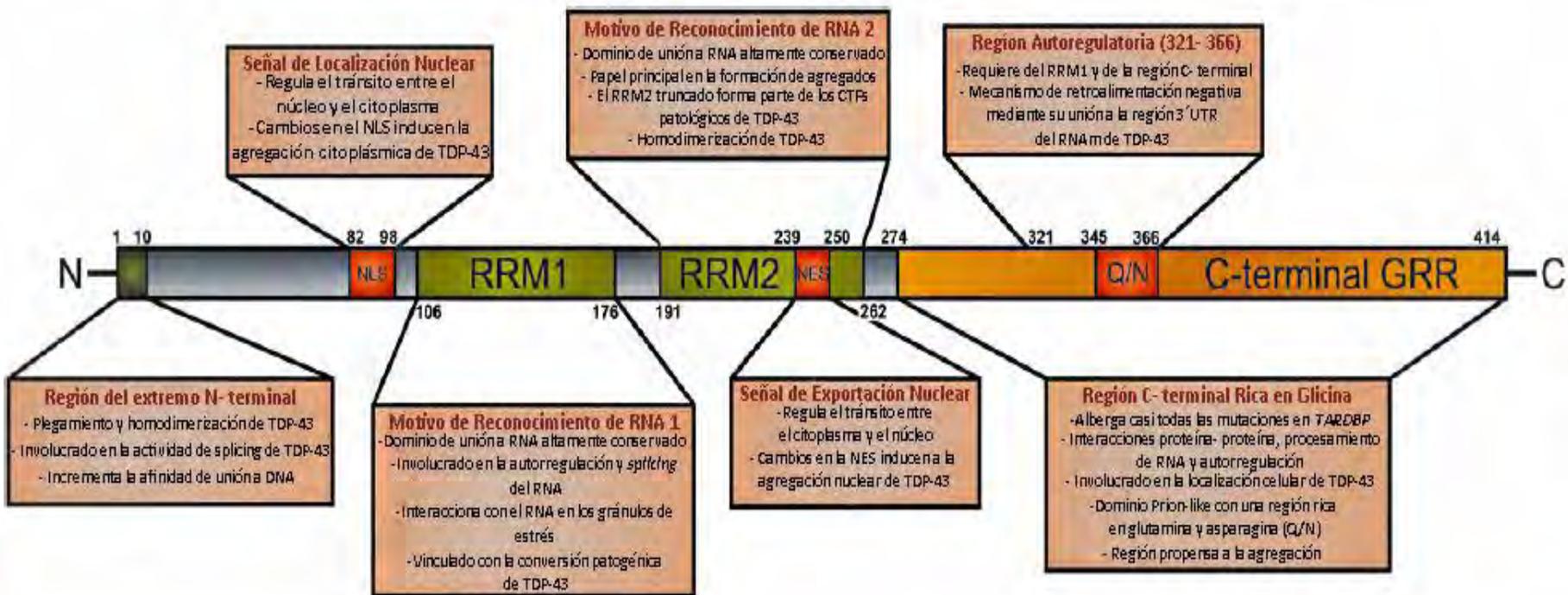


Figura 4. Esquema de la organización por dominios y regiones de la proteína TDP-43. Se muestra la constitución de la proteína en su forma completa, así como una descripción de las funciones y características propuestas hasta el momento para cada uno de los dominios y regiones. Tomada y modificada de Janssens J. and Broeckhoven 2013. [50]

**Regulación transcripcional:** TDP-43 se identificó por primera vez como represor transcripcional, uniéndose a la región LTR- DNA del VIH-1; sin embargo, se tiene conocimiento de otros procesos en los cuales TDP-43 ejerce su función como regulador transcripcional. Es capaz de unirse a regiones ricas en polipirimidinas inhibiendo el reclutamiento de proteínas de unión a la caja TATA (TBP), lo cual reprime el proceso de expresión y se ha observado que también regula la transcripción en mamíferos, el ejemplo mejor caracterizado ocurre durante la espermatogénesis del ratón, donde TDP-43 promueve la represión transcripcional del gen codificante para la proteína acrosomal SP- 10, generando espermátidas redondas. Adicional a la regulación de genes específicos, se ha reportado que TDP-43 interactúa con las subunidades del complejo mediador que se une a la cola del carboxilo terminal de la RNA-polimerasa II (pol-II) estimulando la iniciación, así como la re-iniciación de la transcripción. De esta manera se propone que TDP-43 puede ejercer un efecto negativo o positivo sobre la transcripción dependiendo del contexto [28- 32].

**Proceso de *splicing*:** La interacción entre TDP-43 y la maquinaria de *splicing* está fuertemente apoyada por la homología de esta proteína con la familia de hnRNPs las cuales juegan un papel importante en el proceso de *splicing* y transporte del RNA. El primer sustrato de *splicing* identificado para TDP-43 fue el regulador de conductancia transmembranal en fibrosis quística (CFTR), en el cual promueve la omisión del exón 9.

El gen *SMN2* es también un objetivo de TDP-43, ya que éste se une a la región promotora de *splicing* 2 (SE2) rica en AG del pre-mRNA de *SMN2*, lo que promueve la inclusión del exón 7. Finalmente, el gen de la apolipoproteína A-II (*ApoA- II*) posee un tramo de guaninas y uracilo (GU) en el intrón 2 al que se une TDP-43, promoviendo la omisión del exón 3 en el proceso de *splicing* alternativo. Además, modifica de manera negativa la autorregulación de SC35, un miembro de la familia de proteínas ricas en serina y arginina, involucradas en el proceso de *splicing*. TDP-43 se une a la región represora de *splicing* ubicada dentro de la región 3' no traducible (3'UTR) de SC35 y previene procesos de *splicing* críptico,

lo cual lleva eventualmente a la degradación del mRNA de SC35 mediado por decaimiento sin sentido (NMD) [28- 32].

**Organización nuclear:** Existen análisis que muestran la presencia de TDP-43 en el plasma nuclear y en una fracción de la matriz nuclear, así como en regiones ricas en eucromatina, sitios de transcripción activa y *splicing*-cotranscripcional. A pesar de que los hallazgos no dan información concluyente de la contribución de TDP-43 al proceso de estructuración celular, se propone un posible papel estructural de esta proteína dentro del núcleo.

**Biogénesis de micro-RNAs (miRNAs):** Los miRNAs se derivan de las estructuras en horquilla de los transcritos largos de mRNA, los cuales se pueden unir a secuencias de mRNA complementarios, desestabilizando y reprimiendo la expresión génica.

Se sabe que TDP-43 interactúa con Drosha, la RNasa III involucrada en el procesamiento de los pre-miRNAs. Recientemente Buratti y colaboradores identificaron múltiples miRNAs blancos, en ellos TDP-43 regula su actividad uniéndose a elementos precursores; dos de ellos fueron examinados con detalle por estos autores let-7b y miR- 663. Específicamente, los niveles de expresión de let-7b y miR-663 fueron abatidos y sobrerregulados, respectivamente, en líneas celulares *knockdown* de TDP-43, concluyendo que Tdp-43 es importante en el metabolismo y síntesis de los miRNA [28- 32].

**Estabilización de mRNA:** En varios casos, TDP-43 se une a la región 3' no traducible (UTR) del mRNA de los neurofilamentos de bajo peso molecular (NFL), la cinasa-6 dependiente de ciclinas (CDK6), y la desacetilasa de histonas 6 (HDAC6), lo que se ha ligado a cambios en su estabilidad lo que se demostró en experimentos con cultivos celulares.

Los dominios de reconocimiento de RNA (RRM) de TDP-43 son necesarios para unirse al mRNA de NFL y la sobreexpresión de TDP-43 en líneas celulares se ha asociado con un incremento en la estabilidad del mRNA. Por otro lado, la región 3'UTR del pre-mRNA de CDK6 contiene múltiples repetidos de UG que actúan

como antagonistas, disminuyendo la expresión de manera dependiente de TDP-43. Finalmente, TDP-43 incrementa la estabilidad del mRNA de HDAC6 a través de su unión con la región 3'UTR; de manera interesante la disminución de TDP-43 resulta en una reducción sinérgica de la expresión de HDAC6, sugiriendo que esta proteína opera de manera lineal o compleja en las vías metabólicas del RNA [28-32].

**Transporte y traducción:** TDP-43 ha sido implicado en el transporte dendrítico de mRNA, así como en la traducción local en la sinapsis y ha sido encontrado en gránulos de transporte en neuronas. Aunque la función de TDP-43 no ha sido establecida del todo, se sabe que interactúa con múltiples proteínas claves en la traducción.

Por último, TDP-43 se ha encontrado en gránulos de estrés (SGs) bajo condiciones de estrés celular. Los SGs contienen dentro de su estructura complejos de preiniciación de la traducción, entre los que se encuentran ribosomas, factores de traducción y mRNA, por lo cual se piensa que pueden estar íntimamente relacionados si bien no actuando juntos en procesos biológicos; la regulación de estas estructuras apenas comienza a explorarse [28- 32].

**Funciones indefinidas:** Adicionalmente se han propuesto otras funciones para TDP- 43, como la de exportación y transporte del RNA, degradación de RNA aberrante o defectuoso, así como la regulación de miRNAs; sin embargo a la fecha no existen experimentos concluyentes capaces de atribuir de manera certera dichas funciones a TDP-43.

Cada una de las funciones antes descritas se presenta de manera gráfica en la figura 5.

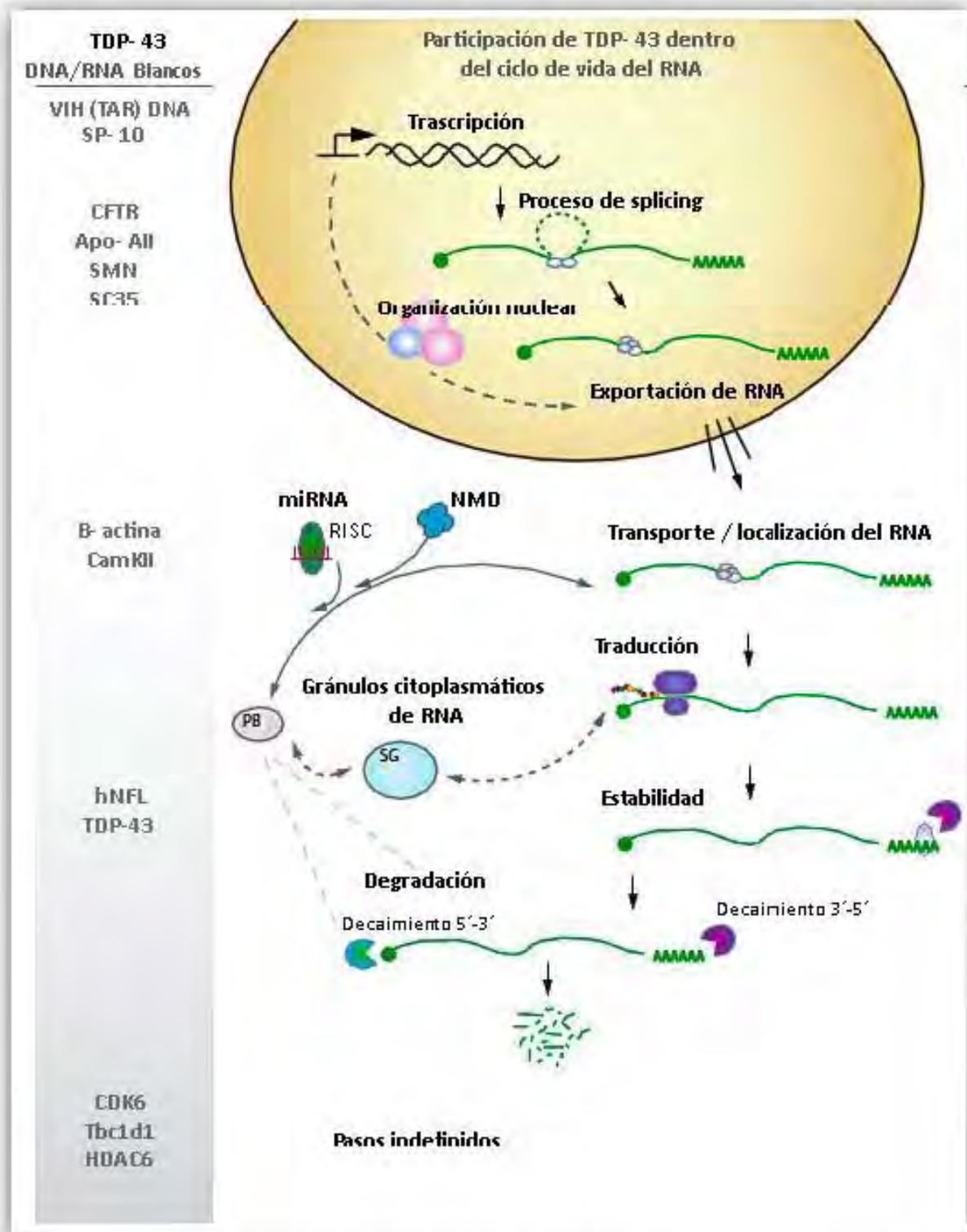


Figura 5. Diagrama de las funciones normales propuestas para TDP-43 dentro de la célula. Se pueden observar las múltiples vías en las que se propone está involucrado TDP-43, así como los posibles blancos con los que se le ha vinculado.

## 5.2 Mutaciones en el gen *TARDBP*

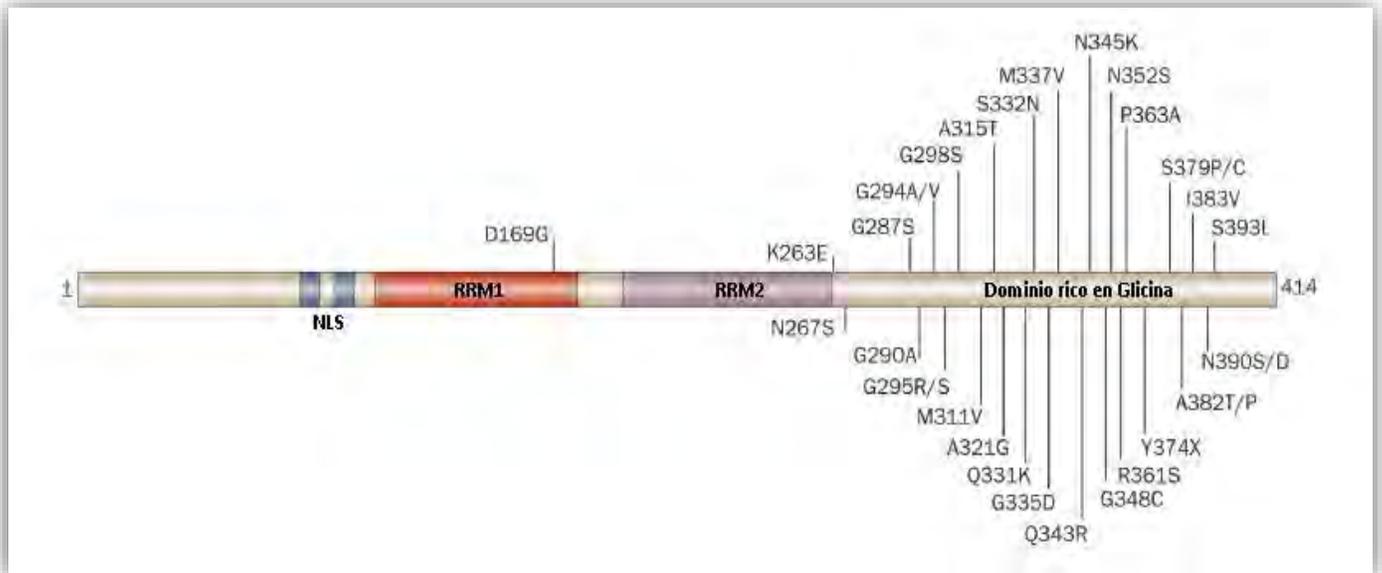
La primera mutación en el gen *TARDBP* fue descrita en el año 2008, se identificó como una mutación de sentido erróneo asociada a casos familiares y esporádicos de Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

A la fecha se han identificado 49 mutaciones, la mayoría de ellas en pacientes diagnosticados con ELA esporádica, todas estas mutaciones muestran un patrón de herencia autosómico dominante. Asimismo, se han observado mutaciones en *TARDBP* asociadas a casos con DFT, los individuos portadores de estas mutaciones presentan deterioro conductual o alteraciones del lenguaje, que posteriormente se acompañan con el desarrollo de síntomas motores, los cuales se observan después de 2 años del inicio de los síntomas.

Las mutaciones encontradas en los casos de DFT, se han descrito también en pacientes con ELA los cuales presentan signos de deterioro cognitivo.

Es importante reconocer que la mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento se ubican o caen dentro del dominio rico en glicina de TDP-43, región importante para los procesos de interacción con otras proteínas y la autorregulación de los niveles de expresión.

En la figura 6 y en la tabla 8 ubicada en el anexo del presente trabajo se muestra el número de mutaciones puntuales identificadas hasta el momento, así como su ubicación dentro de los dominios que conforman a TDP-43, de acuerdo a la base de datos *Molgen*, The Human Gene Mutation Database y Ensembl [47, 48, 49]



**Figura 6. Localización de las mutaciones en *TARDBP*.** Se muestra un diagrama de la ubicación de las mutaciones reportadas hasta el momento, con respecto a la estructura ordenada de la proteína TDP-43, se puede notar que la mayoría de ellas caen cerca de la región C- terminal. Tomada y modificada de Chen-Plotkin et al, 2010. [51]

### 5.3 Mecanismo propuesto de patogénesis.

A partir del hallazgo de las mutaciones en el gen *TARDBP*, se han propuesto posibles mecanismos de patogénesis, los cuales de manera general se asocian con la presencia de los agregados de TDP-43 en los procesos de neurodegeneración. Sin embargo, la toxicidad de los agregados de TDP-43, así como de las modificaciones post-traduccionales que incluyen hiperfosforilación, ubiquitinación y la escisión de los fragmentos C- terminales permanecen poco entendidas [33]. Son escasos los pacientes que portan mutaciones de sentido erróneo en TDP-43, lo cual implica que en la mayoría de ellos la agregación y la depleción nuclear concomitante ocurren de manera natural.

Los primeros estudios con diferentes modelos de ratón, muestran que al menos una mutación (p.A315T) en *TARDBP*, así como la escisión de la señal de localización nuclear (NLS), potencian la deslocalización citoplásmica, incrementando la toxicidad en ausencia de agregados de TDP-43 [34]. Asociado al hecho de que TDP-43 tiene múltiples RNAs como blanco a los que se une directamente, la pérdida de su actividad en el núcleo contribuye a la disminución

en la función de esta proteína, conllevando al desarrollo de la patología; sin embargo, es probable que se requieran de eventos adicionales como el estrés celular y la carga genética, así como de factores de riesgo ambiental, para inducir la patología de TDP-43 [35].

Actualmente, los datos disponibles apuntan hacia un incremento en la predisposición de la agregación de TDP-43 en presencia de mutaciones patogénicas en *TARDBP*, aunque se han obtenido resultados controversiales, ya que se ha observado también que TDP-43 tiende a la agregación en su forma silvestre, para lo cual es necesaria la presencia del dominio C-terminal de la proteína al que se le ha asociado una función parecida a la de los priones, además, se ha implicado al dominio N-terminal y a los motivos de reconocimiento de RNA como parte de la regulación de la formación de inclusiones [36].

Análisis estructurales de la región C-terminal de TDP-43 muestran dominios ricos en glutamina y asparagina (Q/N), que guardan similitud con entidades priónicas. Las proteínas prión muestran de manera normal una auto-agregación, condición que puede ser transmitida de una célula afectada a su progenie por lo que el dominio rico en Q/N en TDP-43 es importante dentro del posible mecanismo de patogénesis [37].

Estudios recientes muestran también que el dominio prión de TDP-43 está involucrado en mecanismos fisiológicos, controlando el proceso de *splicing* y la estabilidad de las proteínas de la maquinaria de *splicing*, asimismo se observa una agregación proteica regulada en respuesta a situaciones de estrés celular, formando gránulos de estrés (SGs). Sin embargo, la deslocalización citoplásmica de TDP-43 es un requisito para su reclutamiento en la formación de los SGs. Se ha sugerido que los SGs, son la base para la generación de agregados patológicos, formados bajo condiciones de estrés celular prolongado asociado además a mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que conforman los SGs de los cuales TDP-43 es un componente importante por lo que surge la pregunta clave de cómo esta agregación regulada por TDP-43 evoluciona a las estructuras patológicas ya mencionadas como inclusiones [38, 39, 40].

Es importante resaltar que la acumulación de proteínas ubiquitinadas presentes en la mayoría de los trastornos neurodegenerativos, sugiere un mal funcionamiento de los procesos, así como de la maquinaria de degradación (que monitorea la calidad de las proteínas) que protegen a la célula de proteínas mal plegadas o disfuncionales. La proteólisis requiere de chaperonas del sistema de ubiquitinación de proteasoma (UPS), del sistema de autofagia dependiente de lisosomas, por lo que se tiene evidencia de que estos sistemas sufren un deterioro en el recién descrito espectro DLFT-ELA, en respuesta a mutaciones en genes cuyos productos tienen diferentes funciones celulares asociadas con la degradación de proteínas; de manera más específica, la mayoría operan como proteínas adaptadoras entre las proteínas ubiquitinadas y el UPS o el sistema de autofagia, necesarios para iniciar la proteólisis. La inhibición de estos procesos da como resultado un incremento en la agregación de TDP-43 y por ende de su toxicidad.

Un ejemplo es la proteína receptora de autofagia p62, codificada por el gen SQSTM1, que ha ganado interés desde su identificación como uno de los componentes de las inclusiones negativas para TDP-43, y positivas para ubiquitina en pacientes con expansión del hexanucleótido repetido C9orf72; asimismo se ha demostrado que una sobreexpresión de p62 conlleva a una reducción en la agregación de TDP-43 [41, 42, 43, 45]. En conjunto, estos hallazgos indican que tanto el UPS como el proceso de autofagia tienen un papel importante en el recambio de TDP-43, sin embargo, la manera específica de cómo éstos modifican o inducen el mecanismo de patogénesis aún requiere de muchos más estudios. En la figura 7 se resume de manera ilustrativa el mecanismo de patogénesis de TDP-43 propuesto hasta el momento.

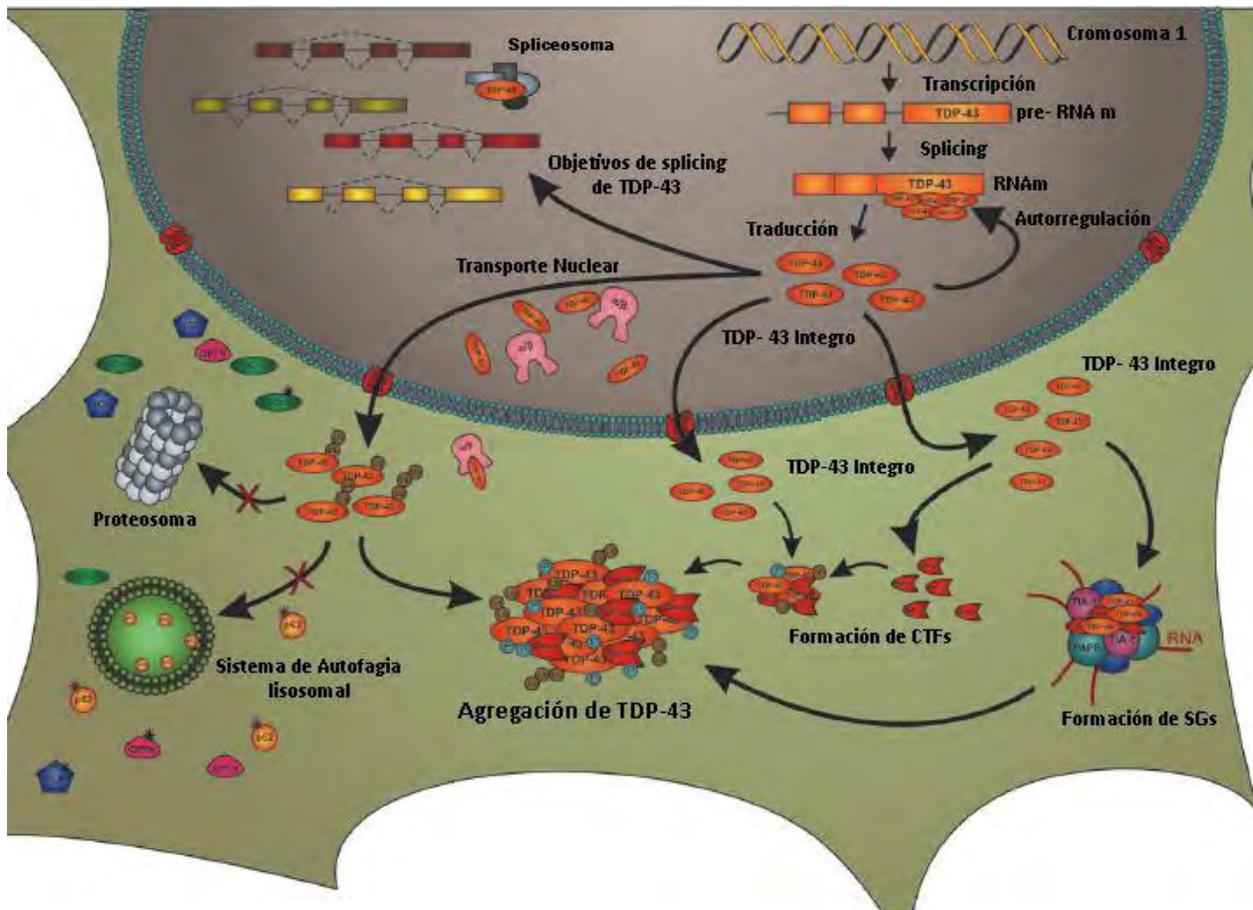


Figura 7. Mecanismo de patogénesis propuesto para TDP-43. Se muestra el proceso de agregación de TDP-43 y la formación de fragmentos carboxilo terminal (CTFs), acoplado al mal funcionamiento de la maquinaria de degradación de proteínas lo que lleva a la formación de gránulos de estrés. Tomada y modificada de Janssens J. and Broeckhoven, 2013 [50].

Como ya se mencionó anteriormente, existe una gran variedad de mutaciones que recaen dentro de la secuencia codificante del gen *TARDBP*, siendo las más frecuentes las ubicadas cerca del extremo carboxilo terminal. A la fecha, el estudio de estas variantes ha sido el principal objetivo en el estudio de DFT, debido en gran medida al efecto directo que estos cambios implican en la secuencia tanto de nucleótidos como en la estructura proteica, que dan como resultado cambios significativos en la función, distribución y eficiencia de la proteína y que a su vez están vinculados con el progreso de la neurodegeneración; sin embargo, existen múltiples variantes en regiones no codificantes asociadas al gen en cuestión.

El estudio de las secuencias no codificantes (intrones), ha tomado mucha relevancia, asimismo con el avance de las nuevas técnicas de secuenciación del genoma ha sido posible distinguir la importancia de estas regiones que anteriormente se consideraron como regiones sin importancia o bien DNA basura. Hoy en día se sabe que muchas de estas regiones en realidad juegan un papel muy importante tanto en los procesos de expresión y regulación de la transcripción, como en los procesos de maduración del RNA; El proceso de corte y empalme de las secuencias exónicas o *splicing*; en donde secuencias intrónicas pueden actuar como reguladores (elementos *cis*), o como secuencias de reconocimiento (secuencias donadoras y aceptoras) para factores que promueven el proceso de *splicing*, y la modificación de los patrones normales del mecanismo, silenciando o potenciando el proceso [52].

El proceso de *splicing* (Sp) y el *splicing* alternativo (SpA), por sí mismos son importantes debido a que su principal objetivo es incrementar el número de proteínas producidas en relación con el número de genes disponibles en nuestro genoma [53, 54, 55]; adicionalmente, el Sp y SpA pueden ejercer funciones regulatorias desde la diversidad del entramado neuronal, hasta la determinación de las funciones fisiológicas de los receptores de unión a membrana en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos [56], ya que errores en los procesos de *splicing* pueden conducir a estados de enfermedad, debido a defectos en la expresión de genes [57- 62].

Las secuencias que actúan como elementos reguladores en *cis* así como las proteínas de unión a RNA que actúan como factores de *splicing* que reconocen y se unen a estos sitios, componen un mecanismo en común que modifica y mantiene los patrones del *splicing* y *splicing* alternativo.

Se sabe que existen enfermedades causadas por mutaciones que recaen en elementos *cis*, un ejemplo de ello son las mutaciones identificadas en el dominio parecido al de los priones (*prion-like*) en la región C-terminal (dominio rico en glicina) de hnRNPA1, las cuales se han ligado a la degeneración muscular en ELA, dominio que podemos encontrar también en TDP-43. En la actualidad, estas

mutaciones en los dominios *prion-like* de proteínas de unión a RNA como TDP-43 y FUS se han vinculado con enfermedades neurodegenerativas [63, 64].

Hasta este momento, el conocimiento sobre los mecanismos que llevan al desarrollo y progreso de las enfermedades neurodegenerativas, en específico de las demencias, permanece inconcluso. A pesar de la identificación de factores tanto genéticos como ambientales; hoy en día no se cuenta con una cura para estas enfermedades ni tampoco algo que detenga su progreso o la aparición de los síntomas por lo que el tratamiento de estos padecimientos se torna aún más difícil. El diagnóstico de los diferentes tipos de demencia no se debe basar únicamente en las características clínicas, se requiere de la contribución del análisis molecular con el cual se obtendrán nuevos conocimientos acerca de los mecanismos que conllevan a estos trastornos.

Adicionalmente se debe tener en cuenta que la realización de un diagnóstico más certero, no sólo permite un mejor abordaje por parte del clínico en el manejo y tratamiento del paciente, sino que abre la posibilidad de llevar a cabo un diagnóstico presintomático, y de esta manera aminorar los riesgos para la descendencia, así como la posibilidad de un mejor asesoramiento genético para las familias.

Este estudio nos permitirá conocer mejor las diferentes variantes genéticas (mutaciones y/o polimorfismos) asociados a la DFT y al gen *TARDBP*.

## **VI. Hipótesis**

Si las mutaciones en el gen *TARDBP* se asocian con el progreso y desarrollo de la patología, entonces un alto número de pacientes con probable DFT presentaran mutaciones en el gen *TARDBP*.

## **VII. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Buscar e identificar mutaciones y/o polimorfismos en el gen *TARDBP* en pacientes con probable demencia frontotemporal (DFT).

### **7.2 Objetivos particulares**

- Estimar frecuencias y prevalencia de las variantes encontradas, en caso de haberlos y discutir sobre su posible contribución al desarrollo de la patología.

## **VIII. Métodos**

### **Población de estudio**

#### **Pacientes**

Se analizaron 30 muestras de pacientes con probable diagnóstico de Demencia Frontotemporal, del Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS). Todos ellos previamente evaluados por las clínicas de neurología y demencias.

#### **Criterios de inclusión.**

Todos aquellos individuos que cumplan con los criterios clínicos del DMS IV de Demencia frontotemporal, previo consentimiento informado del paciente o familiar responsable.

Se incluyó un grupo control de 40 individuos sanos mayores de edad, no relacionados entre sí ni con los pacientes, pero semejantes en edad y género a los pacientes analizados; las muestras fueron obtenidas del banco de DNA del departamento de Neurogenética del INNNMVS y todos ellos cuentan con consentimiento informado.

#### **Toma de muestra**

La obtención de la muestra de sangre periférica se realizó mediante la venopunción, utilizando material estéril en tubos Vacutainer® con capacidad de 6 mL, el cual cuenta con una solución de dextrosa y ácido cítrico como agente anticoagulante. Las muestras fueron preservadas a una temperatura de 4°C, hasta su procesamiento.

En la figura 8 se muestra un diagrama de la metodología general. Los procedimientos de cada paso se explicarán con detalle posteriormente.



**Figura 8. Metodología general**

## **Extracción de DNA genómico por la técnica de Miller modificada.**

- 1) Se transfirieron 3 mL de sangre periférica a un tubo de polipropileno con capacidad para 15 mL, después se adicionaron 9 mL de una solución amortiguadora para lisis de glóbulos rojos (BLGR). Se homogenizó por medio de inversión y se centrifugó durante un lapso de 6 minutos a 835 x *g*. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de BLGR al botón resultante, éste se homogenizó para después ser transferido a un microtubo de polipropileno de 1.5 mL.
- 2) El homogenizado se centrifugó a una velocidad de 835 x *g* durante 2 minutos, el sobrenadante se desechó. Este paso se repitió hasta que el botón de células blancas quedó limpio y libre de hemoglobina.
- 3) Al botón se le adicionaron 570  $\mu$ L de una solución de NaCl 5 mM y se disolvió. Después se adicionaron 40  $\mu$ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, nuevamente se mezcló. Por último, se adicionaron 200  $\mu$ L de una solución de NaCl saturado, se mezcló y se centrifugó durante 20 minutos a 12,200 x *g* con una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL.
- 4) Se adicionaron 700  $\mu$ L de cloroformo- alcohol isoamílico (49:1). Se homogenizó la mezcla y se centrifugó durante 15 minutos a una velocidad de 18,200 x *g* y una temperatura de 4°C.
- 5) Se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo de 1.5 mL y se adicionaron 600  $\mu$ L de etanol absoluto frío, después se mezcló y se centrifugó a una velocidad de 18,200 x *g* durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 600  $\mu$ L de etanol al 70% y se centrifugó bajo las condiciones anteriores. El sobrenadante se desechó y por último el botón se secó en un concentrador al vacío durante 30 minutos.
- 6) El botón fue resuspendido en 250  $\mu$ L de agua estéril, se disolvió por agitación constante a 60°C durante 2 horas. Las muestras de DNA se conservaron a -20°C hasta su análisis.

## **Cuantificación de DNA**

La concentración de DNA de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm, adicionalmente se determinó la relación  $A_{260}/A_{280}$  para conocer la pureza de la muestra.

El equipo utilizado para la determinación de la concentración de DNA fue el NanoDrop 2000, cuyo blanco fue agua estéril y calibrado para la opción de lectura de DNA de doble cadena.

## **Análisis de la integridad del DNA**

El análisis de la integridad se realizó por medio de electroforesis, empleando un gel de agarosa 1% / SB 1X a 100 v por 30 minutos.

Elaboración del gel:

- 1) En una balanza analítica se pesó 1g de agarosa por cada 100 mL de amortiguador SB (buffer de borato de sodio) a una concentración 1X.
- 2) Una vez mezclados la agarosa y el buffer SB se calentaron, hasta la disolución de la agarosa.
- 3) A la mezcla se le adicionó 1  $\mu$ L de bromuro de etidio (10 mg/mL) por cada 100 mL de solución.
- 4) La mezcla se vertió en un molde y se colocaron los peines para formar los pozos en los cuales se carga la muestra de DNA a analizar.
- 5) Se dejó solidificar a temperatura ambiente por una hora y por último se retiraron los peines

### **Realización de la electroforesis.**

- 1) El gel de agarosa ya en estado sólido se colocó en una cámara de electroforesis, y se adicionaron 500 mL de amortiguador SB 1X hasta cubrir por completo el gel.
- 2) Se tomó un volumen de 2.0  $\mu$ L de la muestra de DNA extraída y se mezcló con 2.0  $\mu$ L de colorante de carga (azul de bromofenol, glicerol, Xilencianol) a una concentración 1X.
- 3) Se depositó la mezcla anterior dentro de cada uno de los pozos del gel, también se incluyó un marcador de DNA de peso molecular conocido (GeneRuler™ 1 Kb DNA Leader). El corrimiento se realizó a 100 v durante 30 minutos.
- 4) Al finalizar se colocó en un transiluminador de luz UV y se tomó una fotografía para su análisis, empleando el sistema de fotodocumentación Gel Doc XR, Lab™ Image Software (BIORAD)

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La amplificación de los exones 2 a 6 del gen *TARDBP* se realizó en muestras de DNA genómico, empleando los oligonucleótidos reportados por Hui-Ling et al. en 2010 [46]. Las secuencias de los oligonucleótidos, se muestra en el anexo. Y en la fig. 12 se muestra la secuencia correspondiente a cada exón a analizar y la ubicación de los oligonucleótidos que flanquean dicha región.

La mezcla de reacción para realizar la amplificación de cada uno de los exones a analizar se muestra en la tabla 3, así como la concentración y el volumen empleado para cada reacción.

**Tabla 3. Reacción de PCR para amplificar el gen *TARDBP***

Reactivo	Concentración	Volumen
<i>KAPA2G Robust Mix</i>	10 x	12.5 µL
<i>Primer Forward</i>	10µM ó 25µM	1 µL
<i>Primer Reverse</i>	10µM ó 25µM	1 µL
H <sub>2</sub> O	cbp	9 µL
ADN	100 ng/µl	1.5 µL
	Volumen final de reacción	25 µL

Las condiciones y programa de amplificación empleado para la PCR fueron previamente estandarizadas y se presentan en la tabla 4.

**Tabla 4. Condiciones y programa de amplificación. La temperatura de alineamiento cambia de acuerdo a la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos.**

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	30
Alineamiento	De acuerdo a tm	15 seg	
Extensión	72°C	15 seg	
Extensión final	72°C	1 min	1
Conservación	4°C	∞	1

### **Resolución de los productos de PCR.**

Se determinó el tamaño de los productos de PCR para cada uno de los exones analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa 2%/ SB 1x, comparando con un marcador de DNA de peso molecular conocido (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) que permite determinar el tamaño de los productos de PCR obtenidos para cada uno de los exones del gen *TARDBP*.

### **Purificación de los productos de PCR.**

La purificación de los productos obtenidos de la PCR, se realizó empleando columnas de purificación del estuche comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega®)*, de acuerdo a la metodología proporcionada por el proveedor.

- 1) Se adicionó un volumen de solución de unión a membrana, equivalente al de la reacción de PCR y se mezcló hasta homogenizar.
- 2) Se insertó una minicolumna SV en un tubo colector.
- 3) La mezcla obtenida se transfirió a la minicolumna acoplada al tubo colector y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 4) Se centrifugó por 1 minuto a 16,000 x g, al finalizar se retiró la minicolumna y se desechó el sobrenadante del tubo colector.
- 5) Se acopló nuevamente la minicolumna SV al tubo colector y se adicionaron 700 mL de solución de lavado de la membrana. Se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto. Al finalizar se desechó el sobrenadante del tubo colector.
- 6) El paso 5 se repitió adicionando 500 µL de la solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16,000 x g por 5 minutos.
- 7) Se desechó la solución nuevamente el sobrenadante del tubo colector y se centrifugó otra vez por 1 minuto a 16,000 x g para eliminar toda la solución de lavado.

- 8) La minicolumna se transfirió a un microtubo de 1.5 mL y se adicionó un volumen de 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas; se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y finalmente se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto. Se colectó el sobrenadante que contiene producto purificado, el cual fue nuevamente analizado en un gel de agarosa al 2%; el resto del purificado se conservó a una temperatura de 4°C, hasta su uso.

### 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®)*. Los reactivos utilizados, así como las concentraciones y volúmenes empleados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Reactivos empleados en la reacción de secuenciación. La concentración de oligonucleótido empleada cambia dependiendo de las condiciones de amplificación del producto de PCR.**

Reactivo	Concentración	Volumen
Oligonucleótido	10 $\mu\text{M}$ ó 25 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
Amortiguador	5x	4 $\mu\text{L}$
<i>BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing</i>	-/-	1 $\mu\text{L}$
Agua libre de DNasa	cbp	12 $\mu\text{L}$
Producto de PCR	50 ng/ $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
	Volume final de reacción	20 $\mu\text{L}$

Las condiciones empleadas para realizar la reacción de secuenciación se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones de la reacción de secuenciación.**

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	<b>96°C</b>	<b>30 seg</b>	<b>1</b>
<b>Desnaturalización</b>	<b>95°C</b>	<b>30 seg</b>	<b>25</b>
<b>Alineamiento</b>	<b>50°C</b>	<b>15 seg</b>	
<b>Extensión</b>	<b>60°C</b>	<b>4 min</b>	
<b>Extensión final</b>	<b>72°C</b>	<b>60 seg</b>	<b>1</b>
<b>Conservación</b>	<b>4°C</b>	$\infty$	

#### **Purificación de los productos de secuencia.**

La purificación de los productos de la reacción de secuenciación se realizó con ayuda de columnas de purificación Centri-Sep, de acuerdo a la siguiente metodología:

- I. Se adicionó un volumen de 800  $\mu$ L de agua estéril, a una columna Centri-Sep para hidratarla por lo menos 2 horas antes de su uso, después de lo cual se eliminaron las burbujas residuales por medio de agitación. En caso de no emplearse al momento se pueden conservar en refrigeración a 4 ° C hasta ser utilizadas.
- II. Una vez hidratadas las columnas se eliminó el agua mediante centrifugación a 835 x g durante 1 minuto.
- III. La columna se colocó dentro de un microtubo de 1.5 mL y el producto de la reacción de secuenciación se aplicó con ayuda de una micropipeta en el centro de la columna, sin perforar o deformar el gel formado.
- IV. Se centrifugó durante 2 minutos a 835 x g y se colectó el sobrenadante que contiene el producto purificado que fue secado en un concentrador de vacío.

### **Secuenciación automatizada.**

El producto purificado y seco se hidrató en 15 µL de formamida ultrapura, se homogenizó y se transfirió a una placa de secuencia de 96 pozos. Se desnaturalizó durante 5 minutos a 94°C y se analizó en un secuenciador automatizado de DNA ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*).

### **Análisis de la secuencia.**

El análisis de la secuencia se realizó empleando los programas *Sequencing Analysis v.5.3.*, así como el programa *Sequencher 5.2 (Gene Codes Corporation)* y *Mutation Surveyor V5.0.0* apoyándose de *BLAST* para la obtención de las secuencias consenso y secuencias referencia de cada uno de los exones analizados. Para la examinación de las secuencias intrónicas incluidas dentro de los fragmentos amplificados por PCR, se utilizó el programa *Human Splicing Finder*.

## IX. Resultados

### Población de estudio.

La población total de estudio fue de 30 pacientes con diagnóstico probable de DFT de los cuales 18 correspondieron a formas familiares, 11 casos esporádicos y uno que no fue determinado por falta de información, su distribución se muestra en la figura 9. En la figura 10 se muestran la distribución por género, así como la edad promedio en años y el rango de edad. En este estudio se incluyó un grupo control de 40 sujetos sanos con la misma distribución en género y edad que la muestra de pacientes con DFT

### Distribución de los pacientes

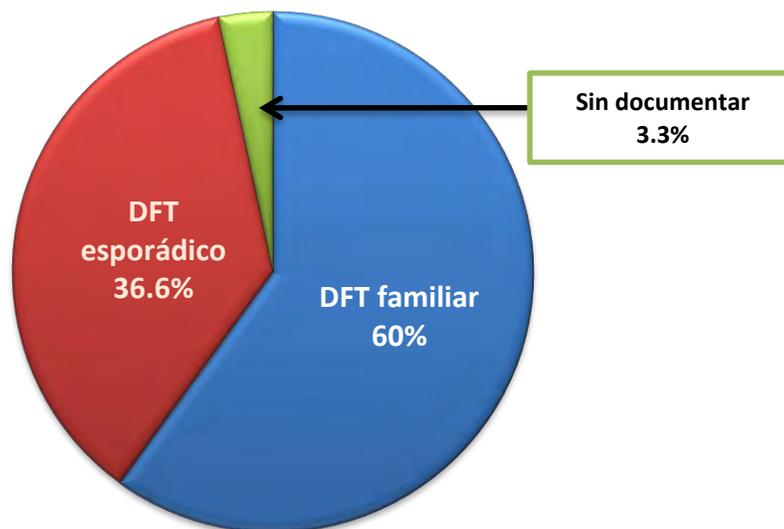


Figura 9. Distribución del total de los 30 pacientes estudiados, se agrupan en base a los antecedentes familiares positivos o negativos en DFT familiar y esporádico.

## Pacientes con demencia frontotemporal

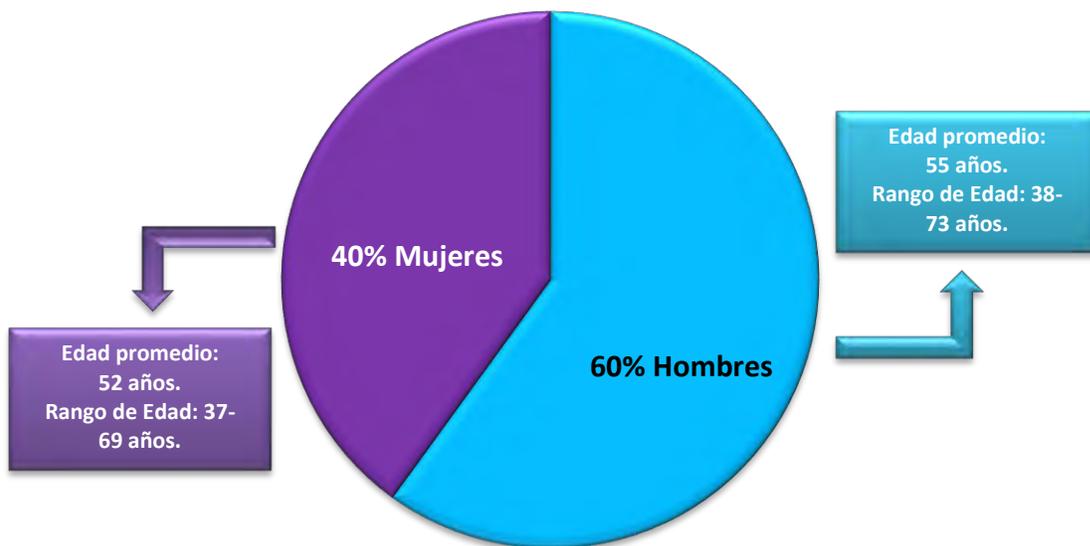


Figura 10. Distribución de género y edad promedio de los pacientes con diagnóstico probable de DFT.

### Quantificación y análisis de integridad del DNA genómico.

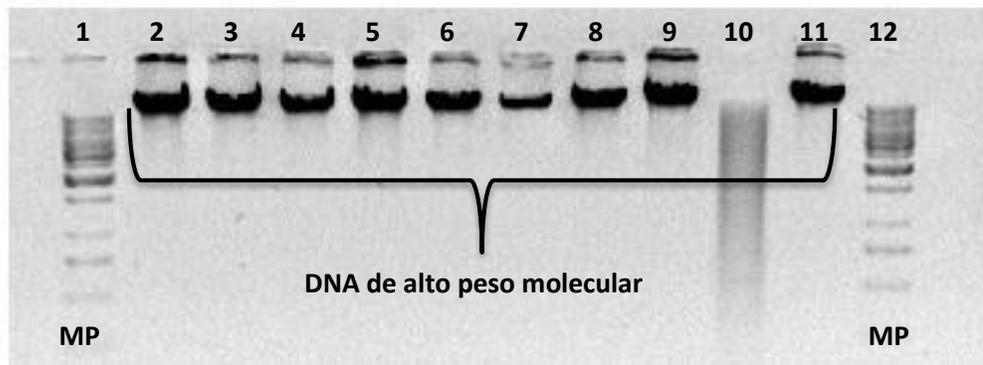
Los resultados de integridad y pureza de las muestras de DNA genómico de los pacientes y del grupo control sano analizados presentaron una concentración promedio de 220 ng/ $\mu$ L con un rango de 100- 482 ng/mL, y una relación  $A_{260}/A_{280}$  promedio de 1.85, lo cual cumple con los rangos establecidos de calidad, pureza e integridad.

En la tabla 7 se da un ejemplo de los datos obtenidos de 10 muestras de pacientes y los resultados de su cuantificación y pureza que representan sólo una parte del total de muestras analizadas en el estudio.

Por otro lado, estos resultados se corroboran al realizar el análisis cualitativo en geles de agarosa en donde se puede observar que el DNA que se obtuvo fue íntegro y de alto peso molecular, al compararlo con el marcador de DNA de peso molecular conocido que flanquea ambos lados del gel, como se puede observar en la Figura 11 donde se visualizan solo algunas muestras a manera de ejemplo.

**Tabla 7. Concentración y pureza de las muestras de estudio**

Muestra	Concentración ng/μL	Relación 260/280
DFT- 1	279	1.87
DFT- 2	163.1	1.86
DFT- 3	387.7	1.88
DFT -4	152.1	1.91
DFT- 5	482	1.84
DFT- 6	245	1.85
DFT- 7	176.1	1.91
DFT- 8	200.4	1.84
DFT- 9	475.8	1.85
DFT- 10	397	1.88



**Figura 11. Imagen de gel de agarosa al 1% donde se muestra el DNA genómico de alto peso molecular como se muestra en los carriles 2- 11 al compararlo con el marcador de DNA de peso molecular (MP) conocido (GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder) puesto en los carriles 1 y 12, en el carril 10 se observa una muestra DNA degradada.**

### **Análisis de los productos de PCR e integridad de los purificados.**

La amplificación de los exones 2 a 6 del gen *TARDBP* permitió la obtención de amplicones de diferentes pesos moleculares correspondientes al peso molecular esperado para cada uno de los exones amplificados del gen, a continuación se

muestra un diagrama con la secuencia del exón y la ubicación de los oligonucleótidos empleados, figura 12.

Adicionalmente se muestra un diagrama de la estructura modular del gen *TARDBP* así como el tamaño de los productos amplificados para cada exón, resueltos en un gel de agarosa al 2% del gel, figura 13.

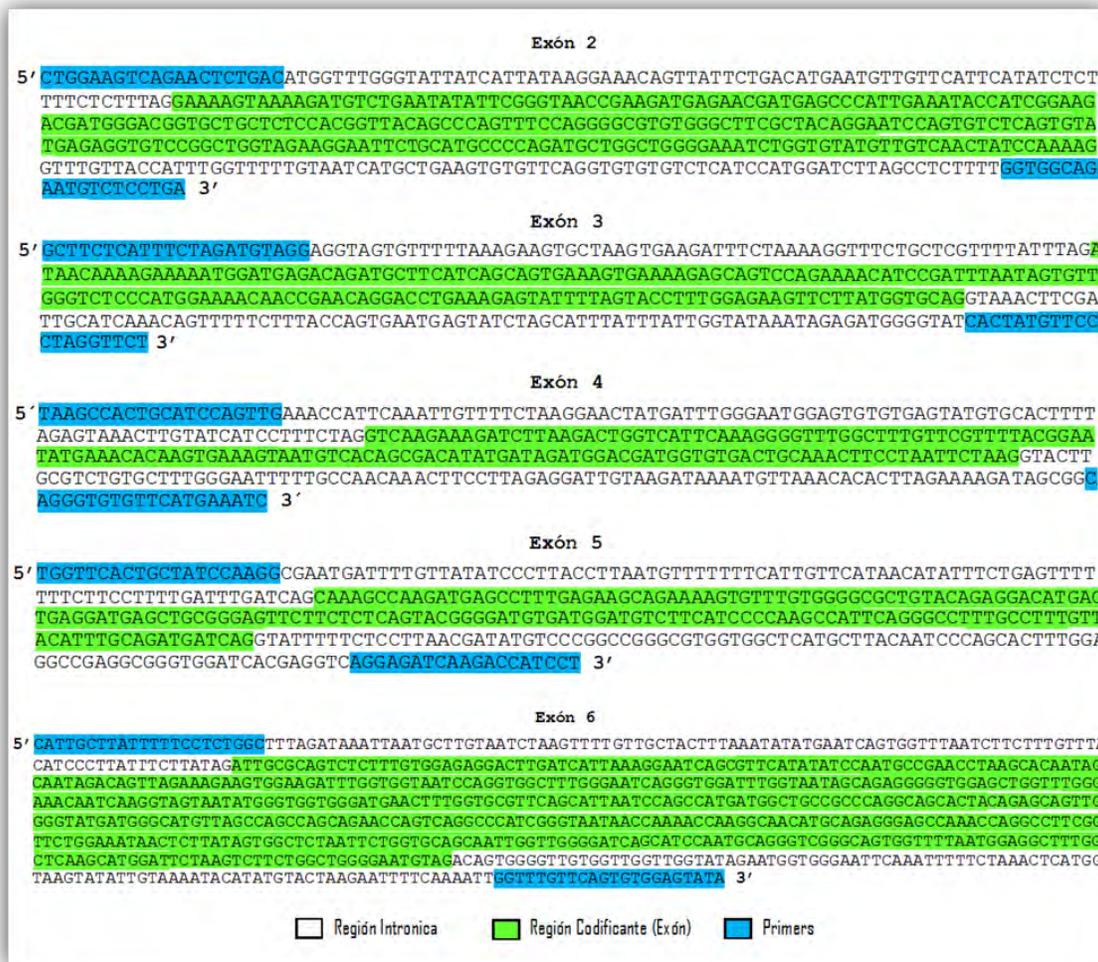


Figura 12. Secuencia de fragmentos amplificados. Se muestra la secuencia de nucleótidos de cada uno de los fragmentos amplificados, correspondientes a cada uno de los exones que conforman el gen *TARDBP*, sombreado en azul se muestra la localización exacta en donde se acoplan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR, en blanco la secuencia intrónica que rodea la secuencia de interés y que abarca parte del amplificado, por último en verde se observa la región codificante del gen.

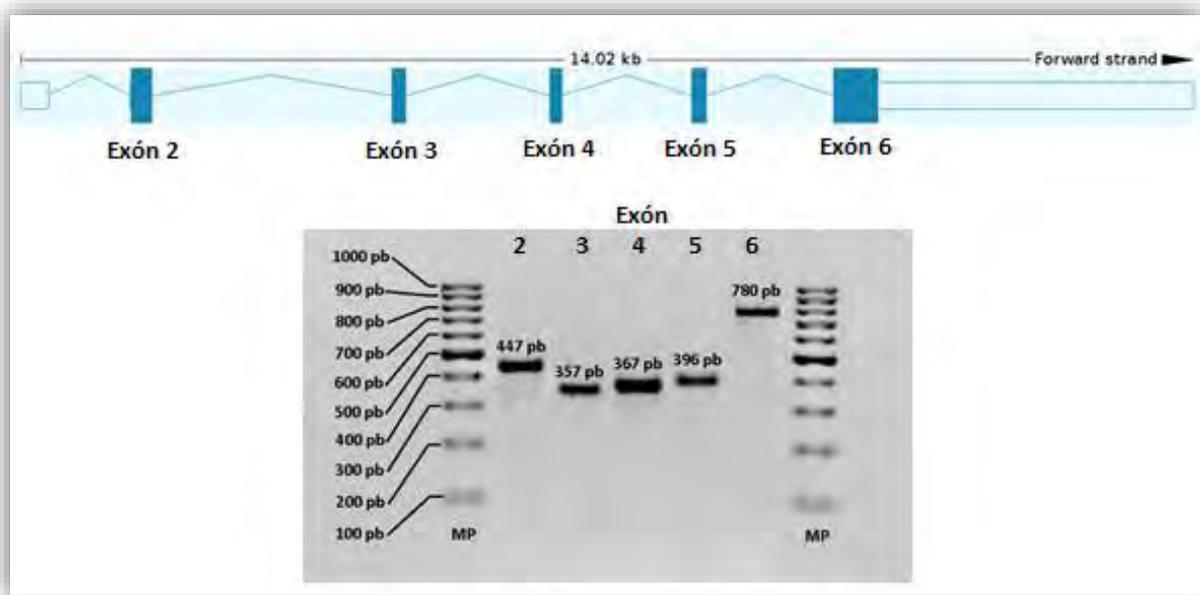
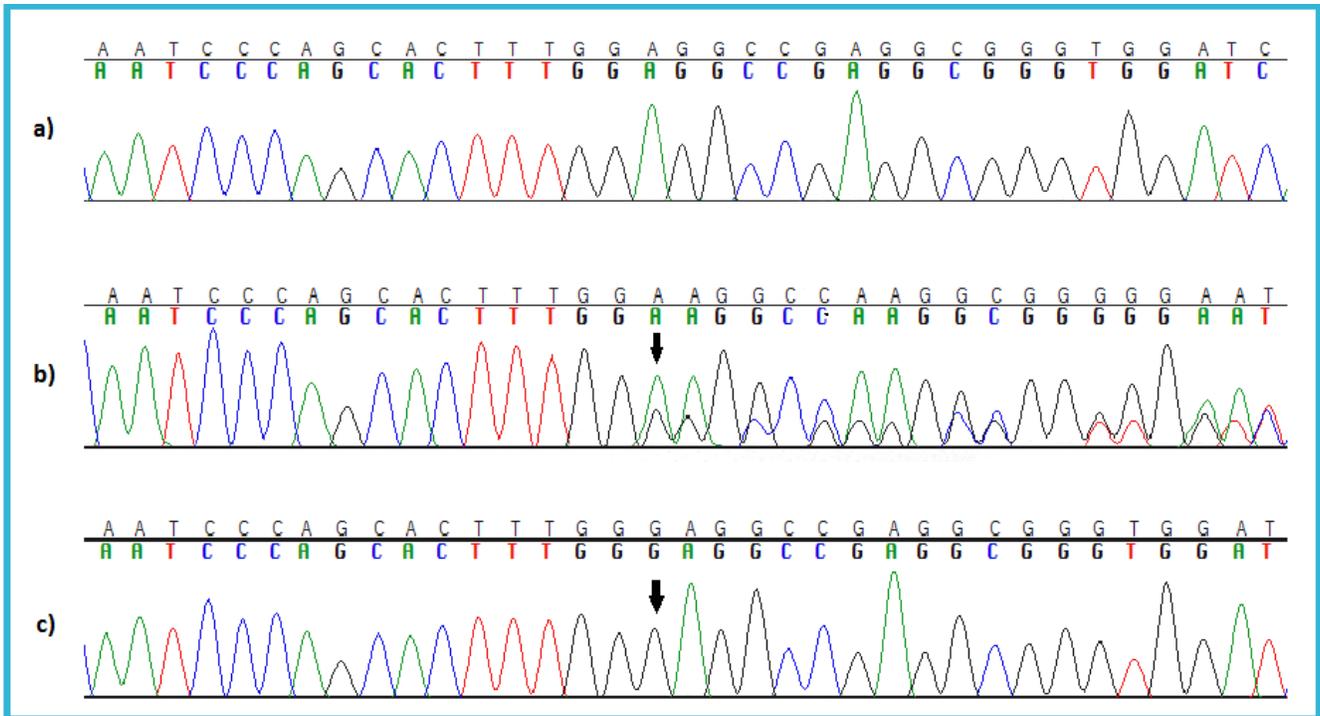


Figura 13. Representación gráfica y la imagen de un gel de agarosa en donde se muestran los exones analizados. En la parte superior de la imagen se muestra una representación de la estructura modular del gen *TARDBP*, <http://www.ensembl.org> [49]. En la parte inferior se observa la resolución de los productos de PCR para cada uno de los exones analizados en un gel de agarosa al 2% flanqueados por un marcador de peso molecular (GenRuler™ 100 bp DNA Ladder) donde se muestran los 5 exones codificantes del gen *TARDBP*, así como su peso molecular correspondiente expresado en número de pares de bases (pb).

### Mutaciones en el gen *TARDBP*.

En el grupo de pacientes analizados no se encontraron mutaciones en los exones analizados, sin embargo el análisis de las regiones intrónicas identificó una inserción en estado homocigoto de una guanina (G) en 24 de 30 pacientes de este estudio, esta inserción se ubica en la región intrónica comprendida entre el exón 5 y 6 del gen *TARDBP*, la cual ya ha sido descrita y se encuentra referida en las bases de datos [48, 49] bajo el ID (rs 397979211), en la figura 15 se muestran los electroferogramas parciales de esta región, donde se observa la inserción en la localización c.714+69\_714+70InsG, de acuerdo a la nomenclatura establecida por la Human Genome Variation Society (HGVS).



**Figura 15. Electroferograma parcial de la secuencia correspondiente al intrón 5-6 de gen *TARDBP*. La flecha señala el cambio que ocasiona la inserción c.714+69\_714+70InsG. En la figura 15-a se puede observar una representación del electroferograma parcial correspondiente a la secuencia silvestre; en la figura 15-b se muestra un electroferograma parcial con el cambio en estado heterocigoto; en la figura 15-c se muestra un electroferograma parcial correspondiente a la secuencia con el cambio en estado homocigoto.**

Esta misma variante se identificó en estado heterocigoto en 6 pacientes, como se muestra en la figura 15-b en donde se muestra un electroferograma parcial de la región donde se presenta la inserción heterocigota de la guanina, la cual se indica por la flecha.

Se identificaron en total 30 casos con la variante rs 397979211, pertenecientes a 13 estados de la República y 2 casos provenientes de individuos con un padre mexicano y uno extranjero (EEUU y Chile) como se muestra en la tabla 10 del anexo del presente trabajo.

La presencia de este polimorfismo en los pacientes analizados requirió de la determinación de su frecuencia en un grupo control sano. En el análisis de las 40 muestras control, se identificó la variante intrónica en estado homocigoto en el 80% de la muestra, que corresponde a 32 de los 40 controles analizados, mientras

que los 8 controles restantes portan la inserción en estado heterocigoto previamente descrito para 6 de los pacientes. En la figura 16 se observan los electroferogramas parciales de la región donde se presenta la inserción en estado heterocigoto y homocigoto. En la figura 17 se muestra un esquema de la localización exacta en donde se presenta el cambio, esta sección corresponde al intrón 5-6 del gen *TARDBP*.

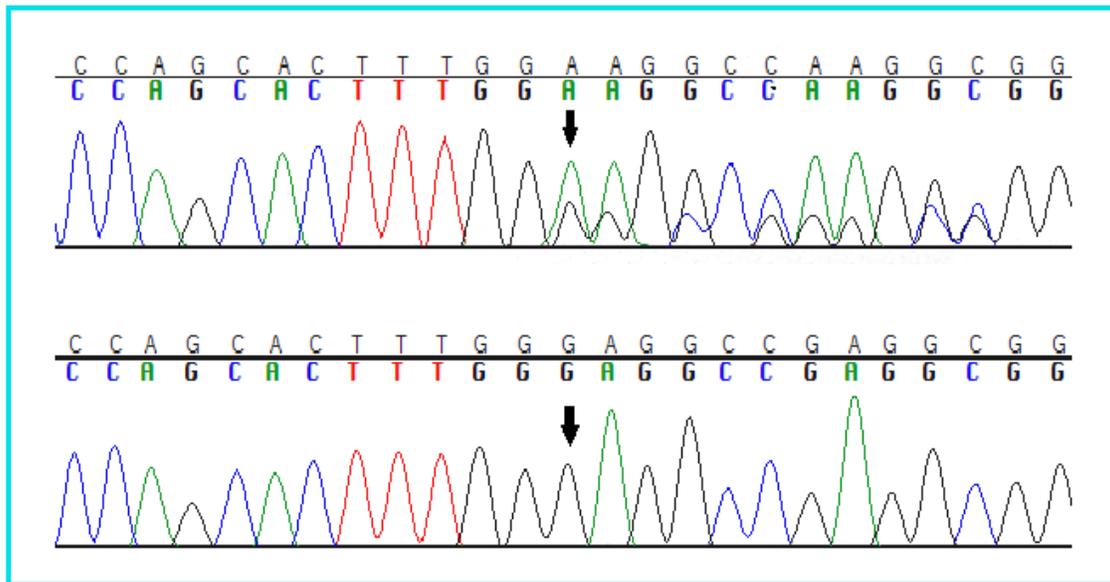


Figura 16. Electroferograma parcial de la secuencia correspondiente al intrón 5-6 del gen *TARDBP*. La flecha señala el cambio que ocasiona la inserción, se muestra la variante en estado heterocigoto y homocigoto respectivamente.

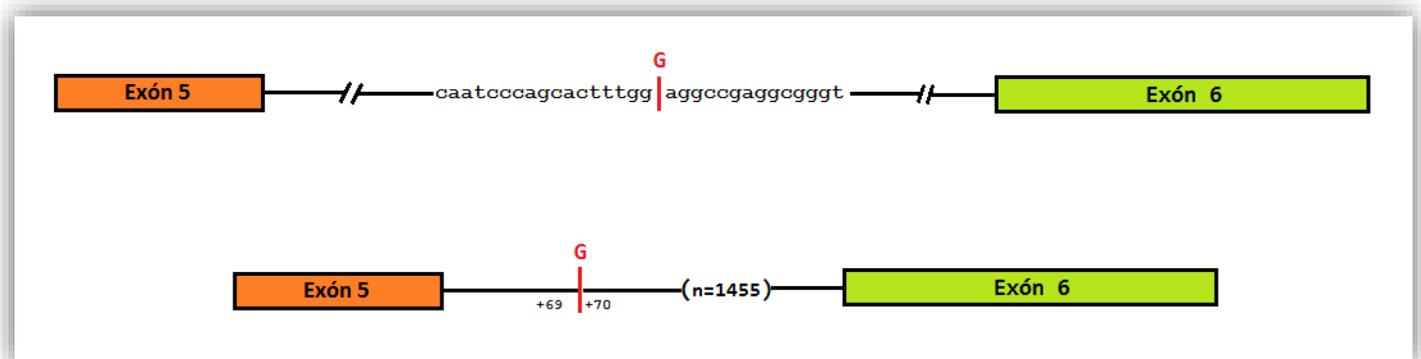


Figura 17. Secuencia parcial normal y mutada correspondiente al intrón 5-6 del gen *TARDBP*, se ilustra la inserción del nucleótido, así como el cambio que ocasiona en la secuencia normal de nucleótidos.

## **X. Análisis de resultados y discusión.**

La población de estudio estuvo representada por 30 pacientes con probable DFT de los cuales el 60%, correspondió a formas familiares lo que concuerda con lo reportado en la literatura en donde se especifica que cerca del 50% de las personas afectadas con este padecimiento presentan una historia familiar positiva; mientras que el 36.6% de la población estudiada son casos esporádicos y un 3.3% de pacientes en la muestra estudiada no fue posible documentar antecedentes familiares patológicos, asociados con la enfermedad en estudio, debido a que desconocen antecedentes de padres o abuelos.

Por otro lado, la distribución de género en la muestra pacientes indica que existe mayor incidencia del padecimiento en hombres que en mujeres, con una razón de 1.5:1, con un promedio de edad de 55 años. Otro aspecto a resaltar es la edad de inicio de la patología en la población en estudio ya que se presenta con una edad promedio de  $53 \pm 10$  años, con edades extremas de inicio del padecimiento en la tercera y séptima décadas de la vida.

De los pacientes estudiados, 24 presentaron la variante intrónica c.714+69\_714+70InsG en estado homocigoto y 6 en estado heterocigoto. Los 24 casos con la inserción en estado homocigoto y los 6 casos que presentaron la variante en su estado heterocigoto corresponden tanto a formas familiares como esporádicas, lo que indica una independencia entre la presencia de este polimorfismo y el patrón de herencia de la patología conocidos hasta el momento.

A pesar de que esta variante fue reportada como un polimorfismo llama la atención que el 100% de los casos lo presenten ya sea en estado homocigoto o heterocigoto, por lo que fue necesario determinar su frecuencia en un grupo control sano.

El análisis de las 40 muestras control sano demostró la prevalencia del polimorfismo rs297979211 en estado homocigoto en el 80% de los casos mientras que el resto fue heterocigoto, presentándose con frecuencias idénticas a las del grupo de pacientes con probable DFT, sin mostrar diferencias estadísticamente

significativas. Esto podría sugerir una contribución nula de dicho polimorfismo al desarrollo de la enfermedad, sin embargo en la actualidad se sabe que muchas de las patologías están dadas por la contribución de estos polimorfismos como factores de riesgo que regulan aspectos complejos de una enfermedad, como ejemplo de la importancia que muchas veces pueden tener estos polimorfismos es el caso de las enfermedades priónicas, en donde es determinante la presencia del polimorfismo del codón 129 (metionina/ valina) y la presencia la mutación D178N se puede condicionar a Enfermedad de Creutzfeldt Jacob por la presencia de metionina y de Insomnio familiar fatal ante la presencia de valina. por lo cual fue necesario realizar un análisis minucioso de la variante en cuestión.

Dada la naturaleza de la variante identificada en la región no codificante y por su proximidad con el exón 5 que codifica para la señal de localización nuclear y el segundo dominio de reconocimiento de RNA, se propuso la realización de pruebas *in silico* para determinar su significancia y efecto del cambio. El análisis bioinformático se realizó con ayuda de la herramienta *Human Splicing Finder* (HSF), programa diseñado para la búsqueda exhaustiva de secuencias consenso reconocidas como posibles regiones participantes en el proceso de *splicing* como sitios aceptores y donadores, así como sitios potenciadores y silenciadores del proceso y *splicing* alternativo. HSF fue construido a partir de la base de datos *Ensembl* y en su interfaz se pueden incluir exones e intrones de todos los genes humanos.

Los resultados obtenidos a partir del análisis con el programa HSF indican que la inserción de la guanina en la posición específica c.714+69\_714+70 promueve la creación de un nuevo sitio aceptor de *splicing*. En la Figura 18 se muestra el diagrama generado resultado del análisis del programa HSF.



Esta inserción ya había sido reportada previamente en el estudio de secuenciación del genoma completo en humano, el donador de la muestra a partir de la cual se realizó dicho estudio fue Craig Venter, sujeto identificado como un hombre caucásico de 61 años, de acuerdo al registro genealógico, la ancestría del donador puede ser trazada hasta el año 1700, estableciendo su origen en Inglaterra; ahora con el hallazgo de la misma variante en la población mexicana, en congruencia con la alta variabilidad en la composición de nuestra población, se propone una amplia distribución del polimorfismo en poblaciones de distintos lugares alrededor del mundo; por lo que resultaría interesante realizar estudios para conocer su presencia y distribución en otras poblaciones.

En este estudio se observó una alta frecuencia del polimorfismo en estado homocigoto y de acuerdo a lo reportado en las bases de datos nos indican que esta inserción representa un alelo ancestral el cual se ha mantenido en nuestra población, sin embargo, sería interesante conocer las repercusiones o beneficios que se tienen con la fijación de este alelo en nuestra población. Aunado a la carencia de estudios funcionales y de la frecuencia de esta variante en otras poblaciones limita las conjeturas que se pueden realizar. Es por esta razón que se propone la realización de estudios a nivel de proteína y RNA que ayuden a comprender la significancia del cambio identificado, así como para poner a prueba las hipótesis propuestas sobre la alteración en los procesos normales de splicing

En el análisis de las secuencias en los exones restantes, no fue posible identificar mutaciones ni de otros polimorfismos en el gen *TARDBP*, contrario a lo reportado en otros estudios, donde la incidencia de mutaciones es alta en pacientes con DFT. Esta información es importante pues al no existir variantes génicas en *TARDBP* que se puedan asociar al padecimiento, se abre la posibilidad a nuevos abordajes metodológicos que nos permitan conocer o aclarar los mecanismos que conllevan al desarrollo de este tipo de patologías. Sin dejar de considerar la participación de otros genes que se han identificado hasta el momento como clave en el proceso de la neurodegeneración presente en los cerebros de estos pacientes.

En la actualidad en el INNN se están realizando estudios en los genes antes mencionados, involucrados en la DFT con la finalidad de mejorar el conocimiento sobre los riesgos que conlleva este padecimiento en la descendencia y de esta forma brindar un asesoramiento genético oportuno. Lo que en un futuro abre la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los pacientes con DFT, o que retrasen los síntomas ya que hasta el momento no existe una cura definitiva para esta enfermedad tan devastadora y de rápida progresión.

## **XI. Conclusiones**

Se identificó la variante intrónica (rs 397979211), cambio referido como una inserción ancestral de guanina en la región c.714+69\_ 714+70, la cual conlleva a la generación de un nuevo sitio aceptor de *splicing*.

Se observó esta variante intrónica (rs 397979211) en estado homocigoto, en el 80% de los casos estudiados, los cuales corresponden tanto a formas familiares como esporádicas de demencia frontotemporal (DFT). Solo se identificó el polimorfismo antes referido en su estado heterocigoto en el 20% de los casos de estudio, que corresponden exclusivamente a casos esporádicos de DFT.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias obtenidas en controles y pacientes.

No se identificaron mutaciones ni otros polimorfismos en el gen *TARDBP*.

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de las demencias en México, lo que permite comprender mejor sus causas y distribución en la población mexicana.

## **XI. Perspectivas**

- Se propone la realización de estudios funcionales de la variante identificada en este estudio, con la finalidad de descartar o corroborar la generación de un nuevo sitio aceptor de *splicing* que resultaron del análisis bioinformático
- Analizar la distribución y frecuencia del polimorfismo rs 397979211 en otras poblaciones.
- Analizar otros genes como *MAPT*, *C9orf72*, *PGRN* *CHMP2B* y *FUS* que se han identificado hasta el momento como participantes clave en el proceso de neurodegeneración.

### **XIII. Bibliografía**

- 1) Berchtold N, Cotman C. (1998). Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer disease: Greco- Roman period in the 1960's. *Neurobiology of Aging*; 19: 173-189.
- 2) Karenberg A, Förstl H. (2005). Dementia in the Greco-Roman World. *Journal of the Neurological Sciences*; 244: 5-9.
- 3) Kurz F. Alexander and Lautenschlager T. Nicola. (2010). The concept of dementia: retain, reframe, rename or replace?. *International Psychogeriatrics*; 22:1, 37-42.
- 4) McKhann G.M., Albert M. S., Grossman M., Miller B., Dickson D., Trojanowski J. Q. (2001). Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the work group on frontotemporal dementia and Pick's disease. *Archives of Neurology*. 58: 1803–1809.
- 5) Onyike U. Chaiadi, Diehl- Schmid J. (2013). The epidemiology of Frontotemporal Dementia. *International Review of Psychiatry*; 25(2): 130-137.
- 6) Vieira T. R., Caixeta L., Machado S., Silva C. Adriana, Nardi E.A., Arias-Carrión O., Carta G. M. (2013) Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature. *Clinical Practice & Epidemiology in Mental Health*; 9: 88-95.
- 7) Rabinovici G. D., Miller B. L. (2010). Frontotemporal Lobar Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs*; 24: 375-398.
- 8) Hodges JR, Davies R, Xuereb J, et al. (2003). Survival in frontotemporal dementia. *Neurology*; 61: 349–54.
- 9) Roberson ED, Hesse JH, Rose KD, et al. (2005) Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology*; 65: 719–25.
- 10) Josephs K.A., Duff y J.R., Strand E.A., Whitwell J.L., Layton K.F., Parisi J.E., et al. (2006). Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. *Brain*; 129: 1385 – 98.

- 11) Rosen H.J., Gorno-Tempini M.L., Goldman W.P., Perry R.J., Schuff N., Weiner M., et al.(2002). Patterns of brain atrophy in frontotemporal dementia and semantic dementia. *Neurology*; 58: 198 – 208.
- 12) Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K., et al. (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*; 58: 1615–21.
- 13) Johnson J.K., Diehl J., Mendez M.F., et al. (2005). Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Archives of Neurology*; 62: 925–30.
- 14) Liu W., Miller B.L., Kramer J.H., et al. (2004). Behavioral disorders in the frontal and temporal variants of frontotemporal dementia. *Neurology*; 62: 742–8.
- 15) Miller B.L., Darby A., Benson D.F., et al. (1997). Aggressive, socially disruptive and antisocial behavior associated with fronto-temporal dementia. *The British Journal of Psychiatry*; 170: 150–4.
- 16) Mendez M.F., Chen A.K., Shapira J.S., et al. (2005). Acquired sociopathy and frontotemporal dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Journal*; 20: 99–104.
- 17) Dickson DW. (2001). Neuropathology of Pick's disease. *Neurology*; 56: 16–20.
- 18) Goedert M., Ghetti B. and Spillantini M. (2012). Frontotemporal Dementia: Implications for Understanding Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*; 4:a006254
- 19) Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, (1989). 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. *The EMBO Journal*; 8: 393–9.
- 20) Knopman DS. (1993). Overview of dementia lacking distinctive histology: pathological designation of a progressive dementia. *Dementia*; 4:132–6.
- 21) Piguet O, Hornberger M, Mioshi E, Hodges JR. (2011). Behavioural-variant frontotemporal dementia: Diagnosis, clinical staging, and management. *The Lancet Neurology* 10: 162–172.

- 22)** Neumann M, Rademakers R, Roeber S, et al. (2009). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain*; Nov; 132 (Pt 11):2922–31.
- 23)** Ferrari R., Hardy J., Momeni P. (2011) Frontotemporal Dementia: From mendelian genetics towards genome wide association studies. *Journal of Molecular Neuroscience*; 45: 500-515.
- 24)** Heetveld S., Ruzzu P and Heutink P. (2015). Genetics of Frontotemporal Dementia. Springer International Publishing Switzerland. Pp. 75- 105.
- 25)** Galimberti D., Scarpini E. (2012) Genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Frontiers in Neurology*; 3: 201-207.
- 26)** Sieben A., Langenhove T., Engelborghs S., Martin JJ., Boon P., Cras P., De Deyn PP., Santens P., Van Broeckhoven C., Cruts M. (2012). The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathologica*; 124: 353-372.
- 27)** Levine T., Daniels R., Gatta A., Wong L. and Hayes M. (2013). The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab- GEFs. *Bioinformatics*; 29(4): 499- 503.
- 28)** Gendron T., Josephst A. and Petrucelli L. (2010). Review: Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43): mechanisms of neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*; 36: 97- 112.
- 29)** Wang H., Wang I., Bose J. and Shen J, (2003). Structural Diversity and Functional Implications of the Eukaryotic TDP Gene Family. *Genomics*; 83: 130-139.
- 30)** Mackenzie I. and Rademakers R. (2008). The role of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Current Opinion in Neurology*; 21(6): 693- 700.
- 31)** Lattante S., Rouleau G. and Kabashi E. (2013). *TARDBP* and *FUS* Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update. *Human Mutation*; 34(6): 812- 826.
- 32)** Fiesel F. and Kahle P. (2011). *TDP-43* and *FUS/TLS*: cellular functions and implications for neurodegeneration; *FEBS Journal*; 278: 3550- 3568.

- 33)** Lee, E.B., Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q. (2012) Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*; 13, 38–50.
- 34)** Guo, W., Chen, Y., Zhou, X., Kar, A., Ray, P., Chen, X., Rao, E.J., Yang, M., Ye, H., Zhu, L. et al. (2011) An ALS-associated mutation affecting TDP-43 enhances protein aggregation, fibril formation and neurotoxicity. *Nature Structural & Molecular Biology*; 18, 822–830.
- 35)** Dormann, D. and Haass, C. (2011) TDP-43 and FUS: a nuclear affair. *Trends in Neuroscience*; 34, 339–348.
- 36)** Johnson, B.S., Snead, D., Lee, J.J., McCaffery, J.M., Shorter, J. and Gitler, A.D. (2009) TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*; 284, 20329–20339.
- 37)** Polymenidou, M. and Cleveland, D.W. (2011). The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell*, 147, 498–508.
- 38)** Wang, I.F., Chang, H.Y., Hou, S.C., Liou, G.G., Way, T.D. and James Shen, C.K. (2012) The self-interaction of native TDP-43 C terminus inhibits its degradation and contributes to early proteinopathies. *Nature Communication*; 3, 766.
- 39)** Wolozin, B. (2012) Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*; 7, 56.
- 40)** Colombrita, C., Zennaro, E., Fallini, C., Weber, M., Sommacal, A., Buratti, E., Silani, V. and Ratti, A. (2009) TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *Journal of Neurochemistry*; 111, 1051–1061.
- 41)** Chen, S., Zhang, X., Song, L. and Le, W. (2012) Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathology*; 22, 110–116.
- 42)** Wang, X., Fan, H., Ying, Z., Li, B., Wang, H. and Wang, G. (2010) Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neuroscience Letters*; 469, 112–116.

- 43)** Van, E.J., Ke, Y.D., Gladbach, A., Bi, M., Gotz, J., Kril, J.J. and Ittner, L.M. (2011) Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PLOS ONE*, 6, e22850.
- 44)** Brady, O.A., Meng, P., Zheng, Y., Mao, Y. and Hu, F. (2011) Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62/SQSTM1. *Journal of Neurochemistry* 116, 248–259.
- 45)** Tanji, K., Zhang, H.X., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H. and Wakabayashi, K. (2012) P62/sequestosome 1 binds to TDP-43 in brains with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Journal of Neuroscience Research*; 90, 2034–2042.
- 46)** Xiong, H., Wang, J., Sun, Y., Wu, J., Chen, Y., Qiao, K., Zheng, Q., Zhao, G and Wu, Z. (2010). Association between novel TARDBP mutations and Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Medical Genetics*. 11: 8.
- 47)** “Alzheimer Disease and Frontotemporal dementia Mutation Data Base”. <http://www.molgen.vib-ua.be/DFTMutations/>. (Fecha de consulta 18/01/2016)
- 48)** National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://ncbi.nlm.nih.gov> . (Fecha de consulta 18/01/2016)
- 49)** e!Ensembl. <http://www.ensembl.org/index.html> . (Fecha de consulta 18/01/2016)
- 50)** Janssens J. and Broeckhoven C., (2013) Pathological mechanisms underlying TDP-43 driven neurodegeneration in FTLD–ALS spectrum disorders. *Human Molecular Genetics*. 22, Rev. 1: 77-87.
- 51)** Chen- Plotkin A., Lee V. and Trojanowski J. (2010) TAR DNA- binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*; 6(4): 211- 220.
- 52)** Lee Y. and Rio D. (2015) Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*. 84: 291-323.
- 53)** Nilsen TW, Graveley BR (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 463:457–63.

- 54) Irimia M, Blencowe BJ (2012). Alternative splicing: decoding an expansive regulatory layer. *Current Opinion in Cell Biology*; 24:323–32.
- 55) Braunschweig U, Gueroussov S, Plocik AM, Graveley BR, Blencowe BJ (2013). Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell*. 152:1252–69.
- 56) Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, Wen Y, Shen M, et al (2013). Function of alternative splicing. *Gene*. 514:1–30.
- 57) Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G (2009). RNA and disease. *Cell*. 136:777–93.
- 58) Padgett RA (2012). New connections between splicing and human disease. *Trends in Genetics*; 28:147–54.
- 59) Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics*. 90:41–54.
- 60) Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*; 3:285–98.
- 61) Pagani F, Baralle FE (2004). Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature Reviews Genetics*. 5:389–96.
- 62) Krawczak M, Thomas NS, Hundreiser B, Mort M, Wittig M, et al (2007). Single base-pair substitutions in exon–intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Human Mutation* 28:150–58.
- 63) Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, et al (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*. 495:467–73.
- 64) King OD, Gitler AD, Shorter J (2012). The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Research*; 1462:61–80.

## XIV. Apéndice

### 14.1 Reactivos

- ❖ Agarosa ultrapura (Bio-rad®)
- ❖ Alcohol absoluto
- ❖ Alcohol al 70%
- ❖ Bromuro de etidio
- ❖ Buffer BLGR
- ❖ Buffer SB 1x
- ❖ Cloroformo- alcohol isoamílico en proporción 49:1
- ❖ Kit de purificación de PCR (Promega®).
- ❖ Kit de secuenciación: Big Dye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing (AB).
- ❖ Marcador de peso molecular: GeneRuler™ Long Range DNA Ladder y GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder.
- ❖ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 2 del gen *TARDBP*.  
5´- CTGGAAGTCAGAACTCTGAC-3´  
5´- TCAGGAGACATTCTGCCACC-3´
- ❖ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 3 del gen *TARDBP*.  
5´- GCTTCTCATTCTAGATGTAGG-3´  
5´- AGAACCTAGGGAACATAGTG-3´
- ❖ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 4 del gen *TARDBP*.  
5´- TAAGCCACTGCATCCAGTTG-3´  
5´- GATTTTCATGAACACACCCTG-3´
- ❖ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 5 del gen *TARDBP*.  
5´- TGGTTCCTGCTATCCAAGG-3´  
5´- AGGATGGTCTTGATCTCCT´-3´
- ❖ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 6 del gen *TARDBP*.  
5´- CATTGCTTATTTTTCTCTGGC-3´  
5´- TATACTCCACACTGAACAAACC-3´
- ❖ PBS 10% (amortiguador fosfato salino)
- ❖ SDS 10%: Dodecil sulfato de sodio (10 g/1L).
- ❖ Solución de NaCl 5 mM
- ❖ Solución de NaCl sobresaturada

- ❖ Estuche comercial DNA polimerasa HotStarTaq Master Mix (QIAGEN)
- ❖ Estuche comercial DNA polimerasa KAPA2G Robust Hot Start Ready Mix (Kapa Biosystems)

## **14.2 Materiales y Equipos**

- ❖ Agitador: Vortex Genie 2 (Daiger)
- ❖ Balanza analítica: AA-200 (Denver Instrument Company)
- ❖ Cámaras de electroforesis horizontal (Bio-Rad)
- ❖ Centrífugas: Eppendorf 5810R, Eppendorf 5415D
- ❖ Concentrador de vacío: Eppendorf 5301
- ❖ Espectrofotómetro: NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- ❖ Fotodocumentador: Bio-Rad Gel Doc XR+
- ❖ Fuente de poder: Bio-Rad PowerPac 3000
- ❖ Secuenciador de DNA Mod ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems)
- ❖ Termocicladores: Applied Biosystems 2720, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
- ❖ Termomezclador: Eppendorf Thermomixer Comfort.
- ❖ Transiluminador: Labnet DNA Light
- ❖ Micropipetas de volumen variable (Gilson)
- ❖ Tubos de 25 mL (Falcon)
- ❖ Microtubos de 0.2- 1.5 mL (Eppendorf)
- ❖ Tubos Vacutainer con anticoagulante ACD (citrato de sodio)
- ❖ Gradilla de almacenamiento
- ❖ Parafilm (Parafil M®)
- ❖ Columnas de purificación: CENTRI-SEP (Princeton Separations)

## XV. Anexo

**Tabla 8. Variaciones y polimorfismos reportados para el gen *TARDBP* en bases de datos.**

DNA Inicial	DNA Final	AA Inicial	AA Final	Codón	Exón	Referencia
<b>gagAACgat</b>	<b>gagAATgat</b>	Asn	Asn	N12N	2	Luquin (2009) Neuromuscul Disord 19, 696
<b>gtgCTGctc</b>	<b>gtgCTActc</b>	Leu	Leu	L27L	2	Kirby (2010) Neurogenetics 11, 217
<b>ctcTCCacg</b>	<b>ctcTCTacg</b>	Ser	Ser	S29S	2	Corrado (2009) Hum Mutat 30, 688
<b>gatGCTggc</b>	<b>gatGCCggc</b>	Ala	Ala	A66A	2	Kirby (2010) Neurogenetics 11, 219
<b>gatGCTtca</b>	<b>gatGTTtca</b>	Ala	Val	A90V	3	Winton (2008) FEBS Lett 582,2252
<b>acaTCCgat</b>	<b>acaTCTgat</b>	Ser	Phe	S104F	3	Kirby (2010) Neurogenetics 11, 219
<b>aagAAAgat</b>	<b>aagAAGgat</b>	Lys	Lys	L137L	4	Kirby (2010) Neurogenetics 11, 220
<b>ataGGTgga</b>	<b>ataGATgga</b>	Asp	Gly	D169G	4	Kabashi (2008) Nat Genet 40, 572
<b>cagTACggg</b>	<b>cagTATggg</b>	Tyr	Tyr	Y214Y	5	Gijssels (2009) Neurobiology of Aging 30, 1329
<b>cctAAGcac</b>	<b>cctGAGcac</b>	Lys	Glu	L263Q	6	Kovacs (2009) Mov Disord 24,1843
<b>agcAATaga</b>	<b>agcAGTaga</b>	Asn	Ser	N267S	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,688
<b>cagGGTgga</b>	<b>cagAGTgga</b>	Gly	Ser	G287S	6	Kabashi (2008) Nat Genet 40,572
<b>tttGGTaat</b>	<b>tttGCTaat</b>	Gly	Ala	G290A	6	Van Deerlin (2008) Lancet Neurol 7, 409
<b>aatAGCaga</b>	<b>aatAACaga</b>	Ser	Asn	S292N	6	Xiong (2010) BMC Med Genet11, 8
<b>agaGGGggt</b>	<b>agaGCGggt</b>	Gly	Ala	G294A	6	Sreedharan (2008) Science 319,1668
<b>agaGGGggt</b>	<b>agaGTGggt</b>	Gly	Val	G294V	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,688
<b>gggGGTgga</b>	<b>gggCGTgga</b>	Gly	Ser	G295S	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,689
<b>gggGGTgga</b>	<b>gggAGTgga</b>	Gly	Arg	G295R	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,690
<b>gctGGTttg</b>	<b>gctAGTttg</b>	Gly	Ser	G298S	6	Van Deerlin (2008) Lancet Neurol 7, 409
<b>gggATGaac</b>	<b>gggGTGaac</b>	Met	Val	M311 V	6	Lemmens (2009) J Neurol Neurosurg Psychiatry 80, 354
<b>ggtGCGttc</b>	<b>ggtACGttc</b>	Ala	Thr	A315T	6	Gitcho (2008) Ann Neurol 63,535
<b>ggtGCGttc</b>	<b>ggtGAGttc</b>	Ala	Glu	A315E	6	Fujita (2011) Neurology 77,1427
<b>ccaGCCatg</b>	<b>ccaGGCatg</b>	Ala	Gly	A321G	6	B'umer (2009) J Neurol Neurosurg Psychiatry 80, 1283
<b>ccaGCCatg</b>	<b>ccaGTCatg</b>	Ala	Val	A321V	6	Kirby (2010) Neurogenetics 11,217
<b>ctaCAGagc</b>	<b>ctaAAGagc</b>	Gln	Lys	Q331K	6	Sreedharan (2008) Science 319,1668
<b>cagAGCagt</b>	<b>cagAACagt</b>	Ser	Asn	S332N	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,688
<b>tggGGTatg</b>	<b>tggGATatg</b>	Gly	Asp	G335D	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,689
<b>atgATGggc</b>	<b>atgGTGggc</b>	Met	Val	M337 V	6	Sreedharan (2008) Science 319,1668
<b>agcCAGcag</b>	<b>agcCGGcag</b>	Gln	Arg	Q343R	6	Rutherford (2008) PLoS Genet4, e1000193
<b>cagAACcag</b>	<b>cagAAAacag</b>	Asn	Lys	N345K	6	Rutherford (2008) PLoS Genet4, e1000194
<b>tcaGGCcca</b>	<b>tcaGTCcca</b>	Gly	Val	G348V	6	Kirby (2010) Neurogenetics 11,217

<b>tcaGGCcca</b>	tcaTGCcca	Gly	Cys	G348C	6	Kabashi (2008) Nat Genet 40,572
<b>ggtAATAac</b>	ggtAGTaac	Asn	Ser	N352S	6	K'hnlein (2008) Arch Neurol65, 1185
<b>ggtAATAac</b>	ggtAACaac	Asn	Asn	N352N	6	Guerreiro (2009) PLoS One 3, 2450
<b>aacATGcag</b>	aacGTGcag	Met	Val	M359 V	6	Borroni (2010) Rejuvenation Res 13, 509
<b>cagAGGgag</b>	cagAGTgag	Arg	Ser	R361S	6	Kabashi (2008) Nat Genet 40,572
<b>gagCCAaac</b>	gagGCAaac	Pro	Ala	P363A	6	Daoud (2009) J Med Genet 46,112
<b>cagGCCttc</b>	cagGCGttc	Ala	Ala	A366A	6	Kamada (2009) J of the Neuro Sciences 284, 69
<b>tctTATagt</b>	tctTAAagt	Tyr	Paro	Y374X	6	Daoud (2009) J Med Genet 46,112
<b>agtGGCtct</b>	agtGACtct	Gly	Asp	G376D	6	Conforti (2011) J Neurol Neurosurg Psychiatry 82, 587
<b>tctAATtct</b>	tctGATtct	Asn	Asp	N378D	6	Tsai (2011) Neurobiol Aging32, 553.e13
<b>aatTCTggt</b>	aatCCTggt	Ser	Pro	S379P	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,688
<b>aatTCTggt</b>	aatTGTggt	Ser	Cys	S379C	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,689
<b>gcaGCAatt</b>	gcaACAatt	Ala	Thr	A382T	6	Kabashi (2008) Nat Genet 40,572
<b>gcaGCAatt</b>	gcaCCAatt	Ala	Pro	A382P	6	Daoud (2009) J Med Genet 46,112
<b>gcaATTggt</b>	gcaATTggt	Ile	Val	I383V	6	Rutherford (2008) PLoS Genet4, e1000193
<b>attGGTtgg</b>	attCGTtgg	Gly	Arg	G384R	6	Millecamps (2010) J Med Genet47, 554
<b>ggtTGGgga</b>	ggtGGGgga	Trp	Gly	W385 G	6	Millecamps (2010) J Med Genet47, 555
<b>tccAATgca</b>	tccAGTgca	Asn	Ser	N390S	6	Kabashi (2008) Nat Genet 40,572
<b>tccAATgca</b>	tccGATgca	Asn	Asp	N390D	6	Kabashi (2008) Nat Genet 40,573
<b>gggTCGggc</b>	gggTTGggc	Ser	Leu	S393L	6	Corrado (2009) Hum Mutat 30,688

**Bases de datos consultadas (Molgen, NCBI, e!Ensembl)**

**Tabla 9. Lugar de origen de los pacientes que presentan la inserción intrónica identificada en el intron 5-6 del gen *TARDBP*.**

Columna1	Columna2	Columna3
No. Paciente	Variación	Lugar de Origen
DFT 1	Inserción Homocigota	Guerrero
DFT2	Inserción Homocigota	Veracruz
DFT 3	Inserción Homocigota	Veracruz
DFT 4	Inserción Heterocigota	Michoacán
DFT 5	Inserción Heterocigota	Sonora
DFT 6	Inserción Homocigota	Edo. de México
DFT 7	Inserción Homocigota	Distrito Federal
DFT 8	Inserción Homocigota	Chiapas
DFT 9	Inserción Homocigota	Querétaro
DFT 10	Inserción Homocigota	Edo. de México
DFT 11	Inserción Homocigota	Campeche
DFT 12	Inserción Heterocigota	Guanajuato
DFT 13	Inserción Homocigota	Distrito Federal
DFT 14	Inserción Homocigota	Morelos
DFT 15	Inserción Homocigota	Edo. de México
DFT 16	Inserción Homocigota	Veracruz
DFT 17	Inserción Homocigota	Edo. de México
DFT 18	Inserción Heterocigota	Nueva York
DFT 19	Inserción Heterocigota	Tabasco
DFT 20	Inserción Homocigota	Tamaulipas
DFT 21	Inserción Homocigota	Guerrero
DFT 22	Inserción Homocigota	Distrito Federal
DFT 23	Inserción Homocigota	Distrito Federal
DFT 24	Inserción Homocigota	Distrito Federal
DFT 25	Inserción Heterocigota	Chiapas
DFT 26	Inserción Heterocigota	Santiago/ Chile