



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DEL HEXANUCLEÓTIDO
REPETIDO GGGGCC EN EL GEN *C9ORF72* EN
PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL
AMIOTRÓFICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ERANDI ITZEL ALANIZ GARCÍA

ASESORA DE TESIS:

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2023



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS
VOCAL: **Profesor:** ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ
SECRETARIO: **Profesor:** PETRA YESCAS GÓMEZ
1er. SUPLENTE: **Profesor:** HERMINIA DE JESUS LOZA TAVERA
2º SUPLENTE: **Profesor:** MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. INGRID FRICKE GALINDO

SUSTENTANTE:

ERANDI ITZEL ALANIZ GARCÍA

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Química, por brindarme el conocimiento y las herramientas necesarias para construirme y desarrollarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo a la realización de esta investigación (proyecto CONACYT no. 2662111) y a la Fundación Gonzalo Río Arronte por su generosa donación al Departamento de Genética del INNNMVS.

A la Dra. Petra Yescas y a la Dra. Ingrid Fricke, por su apoyo, paciencia y guía para el desarrollo de este trabajo. Gracias al Dr. Eleazar Martínez y al Dr. Alberto Vázquez por sus observaciones y palabras alentadoras en la revisión de este escrito.

A mi padres, Rubén y Juanita, que nunca han escatimado esfuerzos para impulsarme a seguir mis metas. Gracias por su dedicación, soporte, cariño y confianza depositada en mí.

A mi hermana Berenice, su compañía y comprensión en cada etapa de mi formación académica y personal ha sido fundamental para mí.

A mis abuelitos: José y Francisca, Ricardo y Luz. Por sembrar en toda la familia las semillas de perseverancia, compromiso, trabajo duro, amor y sabiduría.

A mis tíos, primos y sobrinos, por su confianza y palabras de aliento. Gracias en especial a mi tío Abelino que en toda mi vida académica me ha brindado su conocimiento, su tiempo, sus consejos y motivación

A mis amigos de la F.Q., en especial a Diana Arellano, Vania Domínguez, Magaly Rodríguez, Gerardo Romero, Yessenia Cruz, David Rodríguez, Luis E. Ruiz y Julián Ramírez. La experiencia de la universidad no hubiera sido la misma sin ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, principalmente: Isabel Ávila, Xaviera Juárez, Eva Palacios, Yerye Mayén, Sherlim Samudio, David Casas y Martha Marini. El apoyo que me brindaron y todo lo que me enseñaron lo llevaré siempre conmigo. Entré esperando una buena relación con colegas y salí teniendo amistades entrañables.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
I. ABREVIATURAS	3
II. RESUMEN	8
III. INTRODUCCIÓN	9
3.1 Esclerosis lateral amiotrófica.....	9
3.1.1 Generalidades	9
3.1.2 Epidemiología.....	11
3.1.3 Subtipos de ELA.....	12
3.1.4 Etiología y genética	15
3.1.5 Fisiopatología	17
3.1.6 Diagnóstico.....	21
3.1.7 Tratamiento	24
3.1.8 Espectro ELA/DFT.....	25
3.1.8.1 Variantes de demencia frontotemporal	26
3.1.8.2 Neuropatología de DFT y genes asociados.....	28
3.1.8.3 Diagnóstico y tratamiento.....	29
3.2 Gen <i>C9ORF72</i>	30
3.3 Proteína C9orf72.....	32
3.3.1 Estructura de la proteína	32
3.3.2 Localización subcelular y celular.....	33
3.3.3 Expresión de la proteína en los tejidos	34
3.3.4 Funciones de la proteína	34
3.3.4.1 Función en el tráfico membranal.....	34
3.3.4.1.1 Endocitosis.....	39
3.3.4.1.2 Macroautofagia.	39
3.3.4.1.3 Otras vías de tráfico membranal.....	42
3.3.4.2 Función en el sistema inmune.	42
3.3.4.3 Otras funciones.	44

3.4	Hexanucleótidos repetidos expandidos	45
3.4.1	Hexanucleótidos repetidos y localización.....	45
3.4.2	Número de hexanucleótidos repetidos silvestres y expandidos	45
3.4.3	Consecuencias de hexanucleótidos repetidos expandidos a nivel molecular.....	46
3.4.4	HRE como causante de ELA y ELA/DFT	49
3.4.5	Tratamientos dirigidos hacia el HRE	51
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53
V.	JUSTIFICACIÓN.....	53
VI.	HIPÓTESIS	54
VII.	OBJETIVOS.....	54
7.1	Objetivo general	54
7.2	Objetivos particulares.....	54
VIII.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	55
8.1	Población de estudio.....	55
8.2	Materiales	58
8.3	Métodos	60
8.3.1	Toma de muestra sanguínea	60
8.3.2	Extracción, cuantificación y evaluación de la integridad del DNA	61
8.3.3	PCR de triple cebador	63
8.3.4	Análisis de fragmentos	64
8.3.5	Determinación de hexanucleótidos repetidos	65
8.4	Análisis estadístico	66
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
9.1	Electroforesis de productos de la PCR de triple cebador	67
9.2	Número de hexanucleótidos repetidos	68
9.2.1	En grupo control sano.....	69
9.2.2	En grupo de pacientes con ELA	70
9.2.2.1	Expandidos del hexanucleótido repetido.	73
9.2.3	Comparación entre grupo control sano y grupo de pacientes con ELA .	78

9.2.4 Comparación de la distribución de alelos de la población mexicana con otras poblaciones	80
X. CONCLUSIONES	85
XI. PERSPECTIVAS.....	86
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
XIII. APÉNDICE.....	105
A. CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ELA.....	105
B. FENOTIPOS ASOCIADOS CON HRE EN GRUPO DE PACIENTES.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Presentaciones fenotípicas de la ELA.
- Figura 2.** Fisiopatología de la ELA.
- Figura 3.** Genes asociados al espectro ELA/DFT.
- Figura 4.** Estructura del gen *C9ORF72*, sus variantes transcripcionales producidas por splicing alternativo e isoformas de proteínas para las que codifica.
- Figura 5.** Estructura terciaria de las isoformas C9-L y C9-S de la proteína C9orf72 de intercambio de nucleótidos de guanina.
- Figura 6.** Ciclo de las Rab GTPasas.
- Figura 7.** Estructura del complejo C9orf72-SMCR8-WDR41.
- Figura 8.** Etapas de la macroautofagia.
- Figura 9.** Complejo CSW regula la iniciación y progresión en la macroautofagia.
- Figura 10.** La función del complejo CSW en la respuesta inmune innata.
- Figura 11.** Estructuras formadas por la transcripción y traducción del HRE.
- Figura 12.** Vías patológicas del HRE de *C9ORF72*.
- Figura 13.** Distribución de la edad de inicio de los pacientes evaluados.
- Figura 14.** Origen de los pacientes con ELA evaluados.
- Figura 15.** Metodología general empleada.
- Figura 16.** Integridad de las muestras de DNA.
- Figura 17.** Sitio de unión de los oligonucleótidos en la región del HR.
- Figura 18.** PCR del hexanucleótido de *C9ORF72*
- Figura 19.** Correlación de resultados para determinación de HR en *C9ORF72*.
- Figura 20.** Distribución de la frecuencia de HR de *C9ORF72* en el grupo control.
- Figura 21.** Pacientes con alelos no afectados y expandidos de *C9ORF72*.
- Figura 22.** Distribución de la frecuencia de HR de *C9ORF72* en el grupo de pacientes.
- Figura 23.** Detección de HRE en paciente heterocigoto.
- Figura 24.** Distribución de los hexanucleótidos repetidos expandidos.
- Figura 25.** Distribución de los alelos (HR) en el grupo control y en el grupo de pacientes ELA y ELA/DFT.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Principales genes asociados al desarrollo de ELA.
- Tabla 2.** Criterio El Escorial para diagnóstico de la ELA
- Tabla 3.** Tratamiento farmacológico y no farmacológico para síntomas de ELA.
- Tabla 4.** Variantes clínicas de DFT.
- Tabla 5.** Principales genes asociados al desarrollo de DFT.
- Tabla 6.** Interacción del complejo CSW con pequeñas GTPasas.
- Tabla 7.** Distribución de grupo control sano.
- Tabla 8.** Secuencia de los tres oligonucleótidos para la PCR de triple cebador.
- Tabla 9.** Mezcla de oligonucleótidos para la PCR de triple cebador.
- Tabla 10.** Mezcla de PCR de triple cebador para *C9ORF72*.
- Tabla 11.** Reactivos y volúmenes para análisis de fragmentos.
- Tabla 12.** Datos estadísticos de los hexanucleótidos del grupo control sano.
- Tabla 13.** Datos estadísticos de los hexanucleótidos del grupo de pacientes.
- Tabla 14.** Número de repetidos de los grupos controles sanos y de pacientes.
- Tabla 15.** Número de hexanucleótidos repetidos en diferentes poblaciones del mundo: en individuos sanos y en pacientes sin HRE.
- Tabla 16.** Casos de hexanucleótidos repetidos expandidos en diferentes poblaciones de pacientes ELA y ELA/DFT del mundo.

I. ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius	ANG	Gen que codifica para la angiogenina
µL	Microlitro	AO	Oligonucleótido antisentido
µM	Micromolar	Arf GTPasa	Rama de proteínas de la superfamilia Ras
¹⁸F-FDG-PET	Tomografía por emisión de positrones con ¹⁸ F-fluorodesoxiglucosa	ARNip	RNA de interferencia corto
Aa	Aminoácido	AST	Aspartato aminotransferasa
AAV	Virus adeno-asociado	ATG	Codón de inicio de la traducción
ACC/ACC	Gen y proteína acetil-CoA carboxilasa	ATG	Codón de inicio
ACD	Anticoagulante con solución A o B de citrato trisódico, ácido cítrico y dextrosa	ATP	Adenosín trifosfato
ADARB2	Adenosina Desaminasa B2 RNA específica	ATXN2	Gen que codifica para la ataxina 2
AHF	Antecedentes heredofamiliares	BLGR	Buffer de lisis de glóbulos rojos
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos	bvDFT	Variante conductual de la DFT
ALS-BCA	Evaluación Cognitiva Breve ELA	C21ORF2	Gen que codifica para la proteína C21orf72
ALS-CBS	Evaluación Cognitiva Conductual ELA	C9ORF72	Gen que codifica para la proteína C9orf72
ALS-FRS-R	Escala Revisada de Calificación Funcional de ELA	C9ORF72/ C9orf72	Proteína C9orf72 de intercambio de nucleótidos de guanina
ALS-FTD-Q	Cuestionario ELA/DFT	C9orf72-L/ C9-L	Isoforma mayor o larga de la proteína C9orf72
ALT	Alanina aminotransferasa	C9orf72-S/ C9-S	Isoforma corta de la proteína C9orf72
ALYREF	Factor de exportación Aly/REF	CARM1	Coactivador asociado a la arginina metiltransferasa 1
AMP	Adenosín monofosfato	cGAS-STING	Vía que involucra la sintasa cíclica GMP-AMP y la proteína
AMPA	Receptor ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.		

	estimuladora de genes de interferón	DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CGG	Ciclo glutamina-glutamato	dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
CHCHD10/CHCHD10	Gen y proteína 10 que contiene un dominio espiral-bobina-hélice	DPR	Proteínas de dipéptidos repetidos
CHCl₃	Cloroformo	ECAS	Evaluación de ELA Cognitiva y Conductual de Edimburgo
CHMP2B/CHMP2B	Proteína cargada de cuerpo multivesicular 2B	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
CMCT	Tiempo de conducción motora central	ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
CpG	Islas de citosina y guanina		
CpG ODN	Oligodeoxinucleótidos que contienen DNA/CpG	ELA/DFT	Espectro Esclerosis Lateral Amiotrófica - Demencia Frontotemporal
Cryo-EM	Microscopía crioelectrónica	ELA-bi	ELA con cambios de comportamiento.
CSW	Complejo C9orf72-SMCR8-WDR41	ELA-cbi	ELA con deterioro cognitivo y conductual combinado.
CT	Controles sanos	ELA-ci	ELA con deterioro cognitivo.
DCTN1	Gen que codifica para la dinactina 1	ELA-eci	ELA con evidencia de disfunción ejecutiva.
Deaza GTP	7-Deaza-2'-desoxi-guanosina-5'-trifosfato	ELAf	ELA familiar
DENN	Dominio Expresado Diferencialmente en Células Normales y Neoplásicas)	ELA-neci	ELA sin disfunción ejecutiva, pero deterioro en otros dominios cognitivos.
DFT	Demencia frontotemporal	ELAs	ELA esporádica
DFT-ENM	DFT con evidencia de degeneración en motoneuronas.	ELP	Esclerosis lateral primaria
DFTf	DFT familiar	EMG	Electromiografía
DFTs	DFT esporádica	EWSR1/EWSR1	Gen y proteína de unión a RNA EWS 1
DLFT	Degeneración lobar frontotemporal		
DMSO	Dimetilsulfóxido		

FUS/FUS	Gen y proteína de unión a RNA fusionada en el sarcoma.	HTT	Gen que codifica para la proteína huntingtina
G	gramo	IFN-I	Interferón I
GABA	Neurotransmisor ácido gamma amino butírico	INNMVS	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".
GAP	Proteína activadora de GTPasa	Kb	Kilobases
GDP	Guanosín difosfato	kDa	Kilodalton
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina	KHCO₃	Bicarbonato de potasio
GGGGCC/ G₄C₂	Secuencia del hexanucleótido repetido	KIF5A	Gen que codifica para la quinesina 5A
GluA2	Subunidad del receptor AMPA	L	Litro
GLUL	Glutamato-amoniaco ligasa	LC3-II	Proteína de cadena ligera 1A/1B asociada a microtúbulos en su forma citosólica
GMP	Guanosín monofosfato	LCR	Líquido cefalorraquídeo
GRN	Gen que codifica para proteína progranulina	LDH	Lactato deshidrogenasa
GTP	Guanosín trifosfato	LIMK1/2	LIM Dominio quinasa 1 y 2
GTP	Guanosín trifosfato	IvPPA	Afasia progresiva primaria logopénica
H:M	Proporción de hombres respecto a mujeres	M	Molar/Molaridad
Hab.	Habitantes	MAPT	Gen que codifica para la proteína Tau asociada a microtúbulos
hnRNP H	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea H	MATR3	Gen que codifica para la matrina 3
hnRNPA1/ hnRNP A1	Gen y ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1	MCT1/2	Transportador de monocarboxilato 1/2
hnRNPA2B1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2/B1	MgCl₂	Cloruro de magnesio
HR	Hexanucleótidos repetidos	min	Minuto
HRE	Hexanucleótidos repetidos expandidos	miRNA	microRNA
Ht	Altura	mM	Milimolar
		MMSE	Mini-examen del estado mental

MND	Enfermedad neuromotora	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MPM	Marcador de peso molecular	PFN1	Gen que codifica para la proteína profilina 1
MRI	Resonancia magnética	pH	Potencial de hidrógeno
mRNA	RNA mensajero	PICK1	Proteína que interactúa con C cinasa 1
MSA	Software <i>Microsatellite Analysis</i>	PKR	Proteína K dependiente de RNA
mTORC1	Complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos	Poli-GA	poli-glicina-alanina
MUNE	Estimulación de número de neuronas motoras	Poli-GP	poli-glicina-prolina
NaCl	Cloruro de sodio	Poli-GR	poli-glicina-arginina
NaH₂PO₄	Bifosfato de sodio	Poli-PA	poli-prolina-alanina
NEK1	Cinasa 1 relacionada con NIMA	Poli-PR	poli-prolina-arginina
nfvPPA	Afasia progresiva primaria no fluente agramatical	Rab GTPAsas	Rama de proteínas de la superfamilia Ras. Ej. Rab5 Rab7, Rab11etc.
NF-κB	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas	Rac1	Miembro de la familia Rho GTPasas
Ng	Nanogramo	Rag GTPasa	Rama de proteínas de la superfamilia Ras
NH₄Cl	Cloruro de amonio	RAN/RANT	Traducción no-ATG asociada a la repetición
Nm	Nanómetros	RanGAP1	Proteína 1 activadora de GTPasa Ran
NMI	Neuronas motoras inferiores	RBP	Proteínas de unión a RNA
NMS	Neuronas motoras superiores	RE	Retículo endoplásmico
Nt	Nucleótidos	RNA	Ácido ribonucleico
OPTN/OPTN	Gen y proteína optineurina	RNAi	RNA de interferencia
Pac.	Pacientes	RNAsaH	Ribonucleasa H
Pb	Pares de bases	ROS	Especies reactivas de oxígeno
		rpm	Revoluciones por minuto

SB	Borato de sodio	TLR	Receptor tipo Toll
SDS	Dodecilsulfato de sodio	Tm	Temperatura de fusión de oligonucleótidos
SETX	Gen que codifica para la senataxina	TMS	Estimulación magnética transcraneal
SG	Gránulos de estrés	TUBA4A	Gen que codifica para la proteína tubulina α 4A
siRNA	RNA pequeños de interferencia	UBQLN2	Gen que codifica para la ubiquilina 2
SMCR8/SMCR8	Gen y proteína "región cromosómica del síndrome de Smith-Magenis, candidato 8"	ULK1	Quinasa 1 activadora de la autofagia similar a Unc-51
SNC	Sistema Nervioso Central	ULK1 (complejo)	Complejo formado por las proteínas ULK1, ATG13, FIP200 y ATG101
SOD1/SOD1	Gen y enzima superóxido dismutasa 1	UNC13A	Gen que codifica para la proteína Unc-13 homólogo A
SQSTM1/SQSTM1 p62	Gen y proteína Sequestoma 1 o p62	UV	Ultravioleta
SRSF2	Factor de empalme 2 rico en serina y arginina	V	Volts
SSRI	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina	VAPB	Gen que codifica para las proteínas B y C asociadas a VAMP
STING	Proteína estimuladora de genes de interferón	VCP	Gen que codifica para la proteína contenedora de valosina
svPPA	Afasia progresiva primaria semántica	WDR41/WDR41	Gen y proteína que contiene repeticiones WD 41
Sz	Tamaño en pares de bases		
TAA	Codón de paro		
TAF15/TAF15	Gen y proteína factor 15 asociado a la proteína de unión a la caja TATA		
TARDBP/TDP43	Gen y proteína 43 de unión a DNA TAR		
TBK1	Quinasa 1 de unión a TANK		
TGN	Red trans-Golgi		

II. RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal en donde hay muerte de neuronas motoras que lleva a una parálisis progresiva, mientras que la Demencia Frontotemporal (DFT) es un grupo de trastornos neurodegenerativos que involucran a los lóbulos frontal y temporal donde hay alteraciones lingüísticas y conductuales. Se ha descrito un espectro ELA/DFT que son pacientes con la enfermedad motora y que presentan síntomas o antecedentes familiares de demencia. Una de las causas genéticas que se ha asociado a la ELA y al espectro ELA/DFT es la expansión del hexanucleótido repetido GGGGCC en el gen *C9ORF72*. El número de repetidos en personas sanas ha sido determinado como menor o igual a 30, mientras que los pacientes con hexanucleótidos repetidos expandidos (HRE) presentan más de 30 a hasta miles de repetidos. En este estudio participaron 60 controles sanos y 157 pacientes con diagnóstico de ELA o ELA/DFT que por medio de análisis de fragmentos se les determinó el número de repetidos. Los controles sanos mostraron una media de 9 repetidos, con rango de 1 a 24 hexanucleótidos; el número de repetidos en individuos sanos es similar a las de otras poblaciones del mundo, la variación radica en los procesos de mestizaje en México. El 87.3% de los pacientes evaluados no mostraron repetidos expandidos, teniendo un promedio de 9 repetidos y un rango fue de 1 a 26 hexanucleótidos; por otro lado, el 12.7% de los pacientes mostraron el hexanucleótido repetido expandido de manera heterocigota, con una media de 46 repetidos y un rango de 31 a 66 hexanucleótidos. En este estudio, los fenotipos que se asociaron con el expandido fueron ELA/DFT, ELA familiar, ELA bulbar, ELA espinal, ELA de inicio juvenil, ELA de evolución lenta, ELA asociada a Vulpian-Bernhardt y parkinsonismo. La población de pacientes ELA y ELA/DFT con expandidos que se estudiaron fue mayor a la media mundial, por tanto, el *C9ORF72* es un gen necesario en la evaluación clínica de pacientes mexicanos.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 Esclerosis lateral amiotrófica

3.1.1 Generalidades

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal caracterizada por la muerte progresiva de neuronas motoras superiores e inferiores en el cerebro (corteza motora primaria), tronco encefálico y médula espinal, lo cual lleva a una parálisis muscular gradual, discapacidad grave y muerte por insuficiencia respiratoria. En los últimos años debido a la complejidad de la enfermedad, se ha redefinido a la ELA como un síndrome neurodegenerativo multidominio que es clínica y genéticamente heterogéneo de los sistemas motor y extra-motor con múltiples mecanismos fisiopatológicos subyacentes y diferentes fenotipos clínicos (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009; Brown R.H. y Al-Chalabi, A., 2017; Farg, M.A. et al., 2014; Deng, Z. et al., 2017; Oskarson, B. et al., 2018; Webster, C.P. et al., 2016; Van Es, M.A. et al., 2017). También es conocida como enfermedad neuromotora (MND), enfermedad de Charcot o enfermedad de Lou Gehrig (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

Una de las primeras personas en estudiar esta enfermedad fue el neurólogo Jean-Martin Charcot, quien la describió como un trastorno neurodegenerativo que afectaba a las neuronas motoras inferiores y superiores. En 1874, Charcot publicó su trabajo *Ouvres Completes* en el cual propuso el término “esclerosis lateral amiotrófica” para tal enfermedad (Kumar, D.R. et al, 2011; Oskarson, B. et al., 2018).

La palabra “esclerosis” se refiere al endurecimiento de los tractos corticoespinales anterior y lateral a medida que las motoneuronas de esta área se degeneran y son reemplazadas por gliosis; “lateral” indica la ubicación del daño en la médula espinal; y, “amiotrófica” significa “sin alimento para los músculos” refiriendo a la atrofia de fibras musculares que se denervan conforme se degeneran las células del asta anterior conduciendo a la debilidad de músculos afectados y fasciculaciones visibles. (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009; MDA, 2021).

El inicio de la enfermedad usualmente ocurre a finales de la mediana edad, presentándose como atrofia y debilidad muscular de manera progresiva que

primeramente se presenta de manera focal y después tiende a extenderse con la progresión de la enfermedad. De igual manera se ven involucrados los músculos respiratorios y estos limitan la supervivencia de los pacientes de 2 a 5 años después del inicio de la enfermedad (Mejzini, R. et al., 2019; Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017).

La presentación inicial de la ELA varía entre los pacientes. El 70-80% de ellos presentan la enfermedad de inicio espinal, es decir, con debilidad muscular en las extremidades, con más frecuencia en los músculos distales que proximales. El 20-30% de los pacientes presentan un inicio bulbar caracterizado por disartria (dificultad para hablar) y disfagia (dificultad para tragar), en raras ocasiones también se presenta debilidad en el músculo masetero (Hardiman, O. et al., 2017; Masrori, P. y Van Damme, P., 2020).

Además de los síntomas de disfunción motora, el 35-40% de los pacientes muestran cambios conductuales y/o cognitivos leves. Sin embargo, el 10-15% de los pacientes con ELA presentan demencia frontotemporal (DFT) caracterizada por la degeneración de los lóbulos frontal y temporal en la cual se presentan cambios de comportamiento, deterioro del funcionamiento ejecutivo y/o deterioro del lenguaje. Actualmente se sabe que la ELA y la DFT son dos extremos de un espectro, debido a la superposición de los mecanismos moleculares que subyacen a ambos trastornos neurodegenerativos (espectro ELA/DFT) (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Hardiman, O. et al., 2017).

El 5-10% de los pacientes con ELA tienen al menos otro miembro de su familia afectado y se le denomina a esta forma como ELA familiar (ELAf), generalmente la enfermedad se hereda de manera autosómica dominante. El 90-95% de los pacientes no tienen antecedentes heredofamiliares y la causa de la enfermedad es desconocida, a esta forma se le llama ELA esporádica (ELAs) (Mejzini, R. et al., 2019; Keon, M. et al., 2021).

3.1.2 Epidemiología

La esclerosis lateral amiotrófica a nivel mundial tiene una incidencia de 1.59 casos por 100,000 habitantes (hab.) por año y una prevalencia de 4.42 casos por 100,000 hab. (Xu, L. et al., 2020). Estos datos cambian conforme al área geográfica. En México se ha estimado una incidencia de 1.25 casos por 100,000 hab. por año y 3.41 casos por 100,000 hab. (Brown, C.A. et al., 2021) sin embargo, investigaciones del Tecnológico de Monterrey (TecSalud) han estimado una prevalencia de 5.91 casos por 100,000 hab. (Vega, R., 2020).

La edad de inicio de la enfermedad es variable, siendo alrededor de 55-65 años para ELAs y 40-60 años para ELAf (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009; Van Es, M.A. et al., 2017). Se han reportado casos de edad de inicio hasta los 70 años (Bucheli, M.E. et al., 2012). La edad promedio de inicio en países occidentales es de 65 años, mientras que en países en vías de desarrollo es de 52-57.8 años para ELAs (Bucheli, M.E. et al., 2012). La ELA es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente de la mediana edad y sólo el 5% de los casos de ELA tienen un inicio antes de los 30 años, conocida como ELA de inicio juvenil. El inicio de la enfermedad en la adolescencia tardía o en la adultez temprana es usualmente indicativa de ELAf, aunque el inicio juvenil esporádico también se ha ido reconociendo (Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

El inicio bulbar se presenta con mayor frecuencia en mujeres y en grupos de mayor edad, el 43% de los pacientes mayores de 70 años presentan síntomas bulbares (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009). Los síntomas que se presentan en las extremidades se pueden desarrollar simultáneamente con síntomas bulbares y la mayoría de los casos ocurre dentro de 1 a 2 años (Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

Los hombres tienen mayor probabilidad de desarrollar ELA que las mujeres, el riesgo de desarrollarla es de 1:350 en hombres y 1:400 en mujeres (Keon, M. et al., 2021; Masrori, P. y Van Damme, P., 2020). El ratio de afectación de hombres a comparación de mujeres es de 1.5:1 (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

La parálisis progresiva lleva a una muerte por falla respiratoria de 2-3 años para casos de inicio bulbar y 3-5 años para inicio espinal (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009). Menos del 10% de los pacientes puede vivir 10 años o más (Bucheli, M.E. et al., 2012). La tasa de progresión de la enfermedad puede ser más rápida en pacientes con una edad de inicio avanzada, inicio de tipo bulbar, deterioro cognitivo y ciertos genotipos (Oskarson, B. et al., 2018). La sobrevivencia varía entre poblaciones, es menor en Europa (24 meses) que en Asia central (48 meses) (Hardiman, O. et al., 2017).

En 2016 la tasa mortalidad mundial por ELA fue de 0.46 por 100,000 hab.; esta cifra se incrementa en Norte América, Europa Occidental y Australasia que cuentan con más de la mitad de las muertes causadas por enfermedades de las neuronas motoras (Aktekin, M.R. y Uysal, H., 2020). Poblaciones mestizas pueden tener una menor mortalidad para ELA. En Cuba se reportó una tasa de mortalidad de ELA de 0.55 por 100,000 hab. en una población mixta, pero la tasa se modificaba a ~0.9 por 100,000 hab. en individuos caucásicos o de ancestría africana (Hardiman, O. et al., 2017).

En 2014 se reportó que en México la edad de inicio de ELA es de 47.5 años (menor que en Europa o EUA), presentándose predominantemente en el hombre (radio de afectación 1.8:1). La ELA con inicio espinal es la más frecuente en nuestro país. La sobrevivencia en pacientes mexicanos es de 5.7 años (68.6 meses), mayor que en otros países. Finalmente, en México solo el 3.3% de los casos fueron clasificados como ELA familiar (Martínez, H.R. et al., 2014).

3.1.3 Subtipos de ELA

La ELA clásica o típica es definida por la combinación de signos de afectación en neuronas motoras superiores (NMS) y neuronas motoras inferiores (NMI). Los signos de afectación en NMI son debilidad muscular, atrofia, fasciculaciones y reducción del tono muscular, mientras que los signos en NMS se incluyen hiperreflexia, aumento del tono muscular y lentitud en movimientos. Dentro de la ELA clásica se incluyen los subtipos de inicio bulbar y espinal (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020). Si primero se presenta debilidad en las extremidades superiores

se le denomina al subtipo como “braquial”, si se inicia con afectación en las extremidades inferiores de le llama “crural” (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Orsini, M. et al., 2015).

Aunque la mayoría de los pacientes tienen el fenotipo de ELA clásico, se sabe que la ELA tiene manifestaciones heterogéneas y así hay diferentes presentaciones fenotípicas de la enfermedad. Por ello, el término ELA también describe el espectro de síndromes neurodegenerativos caracterizado por la degeneración progresiva de las neuronas motoras (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017). Las siguientes enfermedades también forman parte del espectro ELA:

A) Subtipos de ELA basados en la participación relativa de NMS versus NMI (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020).

- ELA clásica: involucra ambos tipos de neuronas.
- Esclerosis lateral primaria (ELP): espasticidad y enlentecimiento de los movimientos con signos aislados en NMS, los síntomas inician en las extremidades inferiores y en la región bulbar. La supervivencia de estos pacientes es de más de 20 años. La ELP puede evolucionar a ELA.
- ELA predominante en NMS: Signos más pronunciados en NMS que en NMI. La supervivencia es menor que en PLS, pero mayor a la ELA clásica.
- ELA predominante en NMI: Signos más notorios en NMI y signos limitados en NMS.
- Atrofia muscular progresiva: hay signos aislados en NMI sin evidencia de disfunción en NMS. El 30% de estos pacientes eventualmente desarrollarán signos de NMS.

B) Subtipos según la distribución regional de la afectación. (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017)

- Parálisis pseudobulbar: Ausencia de expresiones faciales, disartria espástica, dificultad para masticar, espasticidad. Al involucrar a NMS, la sacudida de la mandíbula es exagerada o clónica. Hay tendencia a reír o llorar en exceso ante estímulos emocionales menores.
- Parálisis bulbar progresiva: Variante de ELA en donde hay afección en las NMI.
- Síndrome de Mill (variante hemipléjica): Patrón de afectación asimétrico. Síntomas progresivos graduales, la parálisis afecta a los músculos faciales. Los signos piramidales se presentan en el lado de la hemiplejía.
- ELA respiratoria: El problema inicial es debilidad de diafragma y los pacientes que la presentan tienen un mal pronóstico.
- ELA axial: el inicio es en los músculos paravertebrales, el síntoma de presentación es una postura encorvada.
- ELA del brazo débil/caído (síndrome de Vulpian-Bernhardt): afección predominante y progresivo en NMI donde hay debilidad en las extremidades superiores, el patrón de debilidad es simétrico que inicia de los músculos proximales y progresa a una afectación distal.
- ELA de la pierna débil/caída: afección predominante y progresiva en NMI, la atrofia se presenta en extremidades inferiores de manera asimétrica. Su progresión es más lenta que la ELA clásica.
- ELA pseudopolineurítica: debilidad distal de las extremidades inferiores y ausencia del reflejo de tendón de Aquiles, esta variante debe distinguirse de la neuropatía periférica.

Además de que la ELA tiene características motoras (región de inicio o participación de NMS y/o NMI), los pacientes con esta enfermedad pueden presentar características cognitivas (espectro ELA/DFT) (Figura 1).

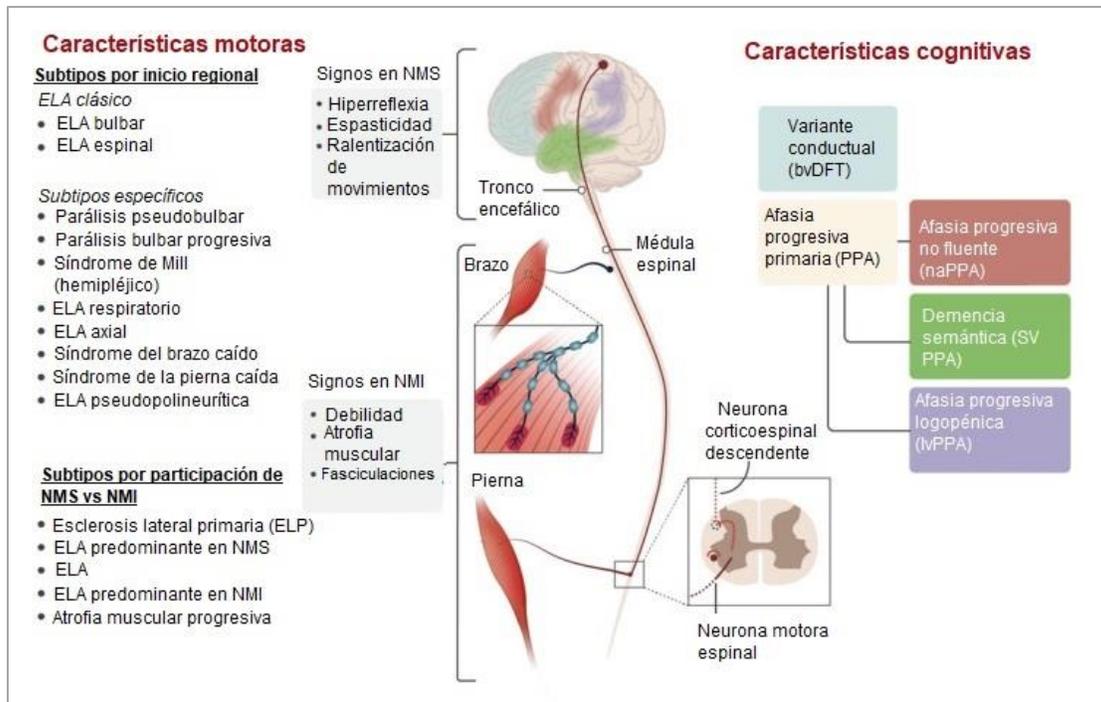


Figura 1. Presentaciones fenotípicas de la ELA. Nota: Las características motoras varían dependiendo de la distribución regional y la participación relativa de NMS versus NMI. Las variantes cognitivas y conductuales se pueden detectar hasta en el 50% de los pacientes. Tomada y modificada de “Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review”, por Masrori, P. y Van Damme, P., 2020, *European Journal of Neurology*, 27(10).

3.1.4 Etiología y genética

La ELA se cree que es causada por factores genéticos, factores ambientales y disfunción relacionada con el envejecimiento (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020). La ELA puede ser descrita como una enfermedad de origen monogénico (relacionada a un solo gen), pero en algunas ocasiones los pacientes con ELA presentan mutaciones (variantes patogénicas) en más de un gen por lo que se sugiere que puede ser de origen oligogénico (un rasgo fenotípico determinado por varios genes) (Turner, M.R. et al., 2017; Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Hardiman, O. et al., 2017). Un modelo oligogénico es consistente con la penetrancia incompleta en muchos pedigríes de ELA, la tasa reducida de ELA en poblaciones genéticamente heterogéneas y la transmisión de múltiples genes en familias con ELA. Asimismo, se ha observado que las variaciones de un gen tienen múltiples manifestaciones fenotípicas (pleiotropía genética), por ejemplo, el gen *C9ORF72* además de causar ELA, está ligado al desarrollo de DFT, Alzheimer, esquizofrenia, desorden bipolar, entre otras enfermedades (Van Es, M.A. et al., 2017; Hardiman, O. et al., 2017;). Se han encontrado más de 30 genes que confieren un riesgo importante para el desarrollo

de ELA (Tabla 1) (Hardiman, O. et al., 2017). Los 4 principales genes que se han asociado son *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* y *C9ORF72* tanto en ELAf y ELAs.

Tabla 1. Principales genes asociados al desarrollo de ELA.

Gen	Locus	% en ELAf	% en ELAs	Patrón de herencia	Proteína codificada	Función
C9ORF72	9p21.2	30-50	7-10	AD	C9ORF72	Autofagia Metabolismo de RNA
SOD1	21q22	20	1-2	AD o AR	SOD1	Antioxidante
TARDBP	1p36.2	3-5	<1	AD	TDP-43	Metabolismo de RNA
FUS	16p11.2	3-5	<1	AD o AR	FUS	Metabolismo de RNA
OPTN	10P13	2-3	-	AD o AR	Optineurina	Tráfico membranal, vía NF-kB, autofagia
PFN1	17p13	1-2	-	AD	Profilina 1	Regulación de la polimerización de actina
VCP	9p13	1-2	-	AD	VCP o p97	Degradación proteica Fusión membranal
ATXN2	12q24	1-2	-	AD	Ataxina 2	Metabolismo RNA Endocitosis
ANG	14q11.2	1-2	-	AD	Angiogenina	Metabolismo RNA Desarrollo de neuritas
TUBA4A	2q35	1	-	AD	Tubulina α4A	Microtúbulos Esqueleto de neuronas
TBK1	12q14.2	1	-	Desconocido	TBK1	Autofagia
SETX	9p34.13	<1	-	AD	Senataxina	Metabolismo y actividad helicasa DNA/RNA
VAPB	20q13	<1	-	AD	VAPB	Regulación y transporte de RE- Golgi
UBQLN2	Xp11	<1	-	XD	Ubiquilina 2	Degradación proteica
CHMP2B	3p11	<1	-	AD	CHMP2B	Endocitosis Tráfico de proteínas
HNRNPA1	12q13	<1	-	AD	hnRNPA1	Metabolismo de RNA
MATR3	5q31.2	<1	-	AD	Matrina	Metabolismo de RNA Silenciamiento de genes
CHCHD10	22q11	<1	-	AD	Proteína mitocondrial	Estabilidad e integridad mitocondrial
SQSTM1	5q35	<1	-	AD	SQSTM1/P 62	Autofagia

Nota: Genes y proteínas relacionadas con el desarrollo de ELA. Se muestra el porcentaje de pacientes con ELA familiar y esporádico que la presentan. El patrón de herencia es autosómico dominante (AD), autosómico recesivo (AR) o dominante ligada a X (XD). Tomada y modificada de “Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review”, por Masrori, P. y Van Damme, P., 2020, *European Journal of Neurology*, 27(10) y “Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis”, por Ghasemi, M. y Brown, R.H., 2018, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(5).

Además de los factores genéticos, se han sugerido factores de riesgo ambientales para ELA. Estos incluyen: tabaquismo, índice de masa corporal, exposición a

metales, pesticidas, neurotoxinas como la β -metilamino-L-alanina, traumatismos craneoencefálicos e infecciones virales. Interesantemente la exposición a hormonas anticonceptivas femeninas podría ser factor de protección contra ELA (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Hardiman, O. et al., 2017; Rooney, J.P.K, et al, 2017).

3.1.5 Fisiopatología

Existen diversos mecanismos propuestos por los cuales se desarrolla la esclerosis lateral amiotrófica:

1. Alteración de la proteostasis y agregación de proteínas: Un hallazgo patológico importante para la ELA es la acumulación de proteínas y los defectos correspondientes en las vías celulares de degradación las proteínas (Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017). Las mutaciones o variantes patogénicas en algunos genes conllevan a un mal plegamiento de las proteínas, tienen una localización celular anormal o pueden alterar directa o indirectamente la maquinaria autofágica, conduciendo a una alteración de recambio de proteínas. En la ELA este mecanismo se ve influenciado por los genes: *VCP*, *UBQLN2*, *C9ORF72*, *VAPB*, *OPTN*, *SQSTM1*, *TBK1* (Hardiman, O. et al., 2017). Debido a la homeostasis alterada de proteínas, TDP-43, FUS y SOD1 son muy propensas a agregarse y formar cuerpos de inclusión intracelulares en las neuronas afectadas en la enfermedad, muchos depósitos de proteínas muestran evidencia de ubiquitinación (Keon, M. et al., 2021; Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017).
2. Alteración del metabolismo de RNA: Las proteínas de unión a RNA (RBP, por sus siglas en inglés) como TDP-43 y FUS se encuentran predominantemente en el núcleo donde se involucran en el metabolismo del RNA. Defectos en las RBP pueden llevar a anomalías importantes en el transcriptoma. Otros genes involucrados en este mecanismo son: *EWS*, *TAF15*, *C9ORF72*, *ANG*, *MATR3*, *hnRNPA1* y *hnRNPA2B1* y *ATXN2* (Mejzini, R. et al., 2019; Masrori, P. y Van Damme, P., 2020). Algunas proteínas no solo se unen a RNA, sino a otras proteínas. Dicha unión se ve aumentada en la ELA, donde hay

autoensamblaje de proteínas y formación de agregados. Estas RBP pueden inducir conformaciones tóxicas que se auto propagan y diseminan la enfermedad entre células (Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017).

3. Defectos en el transporte axonal y citoesqueleto: En las neuronas el movimiento de carga (macromoléculas, vesículas, organelos) a lo largo de axón es necesario. El complejo dineína-dinactina es el motor molecular de transporte retrógrado en axones de NM; mutaciones en el complejo llevan a un desorden en las neuronas motoras inferiores con parálisis de las cuerdas vocales en humanos (Mejzini, R. et al., 2019; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009). La dinámica del citoesqueleto se ve perjudicada si los genes *TUBA4A*, *PFN1*, *KIF5A* y *DCTN1* se ven alterados (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020).
4. Neuroinflamación: En la ELA ha habido evidencia de procesos inflamatorios. La secreción de proteínas inflamatorias por las microglías activadas conlleva la activación neurotóxica de los astrocitos que pueden contribuir a la muerte de neuronas y oligodendrocitos. Los genes *C9ORF72*, *TBK1* y *GRN* están altamente expresados en la microglía e influyen en su función (Mejzini, R. et al., 2019).
5. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo: Mutaciones en *SOD1* causan daño oxidativo a las proteínas mitocondriales y alteran la función de la cadena respiratoria. Variantes patogénicas en *CHCHD10* promueven las uniones de las crestas mitocondriales y daños al mantenimiento del genoma mitocondrial. Mutaciones en *TARDBP* y *C9ORF72* también afectan la función mitocondrial (Hardiman, O. et al., 2017). Por otro lado, el estrés oxidativo es un factor importante en ELA dado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) dañan a las macromoléculas como DNA, proteínas y fosfolípidos, también puede causar desregulación del RNA debido a que causa deslocalización y agregación aumentada en TDP-43 y FUS. *SOD1* es una enzima citosólica antioxidante y, al estar mutada, regula positivamente a las ROS (Mejzini, R. et al., 2019).

6. Excitotoxicidad: Es un proceso patológico de sobreestimulación de receptores (AMPA) de glutamato que resulta en daño neuronal. El nivel de glutamato es bajo y si se incrementa, hay una estimulación excesiva de los receptores, seguido por un flujo masivo de calcio hacia dentro de la célula, elevación de la formación de óxido nítrico y así promoción de la muerte neuronal ([Mejzini, R. et al., 2019](#); [Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009](#)).
7. Transporte nucleocitoplásmico alterado: Se presenta en pacientes con hexanucleótidos repetidos expandidos en el gen *C9ORF72*, causa agotamiento nuclear y localización errónea en el citoplasma de RBP como TDP-43 y FUS ([Mejzini, R. et al., 2019](#)).
8. Disfunción de oligodendrocitos: Los oligodendrocitos son células mielinizadas en el SNC cuya función es producir vainas de mielina para aislar los axones de neuronas. Para la mielinización, los oligodendrocitos producen por glucólisis, lactato que es liberado al espacio peri axonal a través del transportador de monocarboxilato 1 (MCT1), las neuronas pueden absorber lactato a través del MCT2 para apoyar la síntesis de ATP mitocondrial. Si hay cambios en la producción de lactato se contribuye a la degeneración axonal ([Mejzini, R. et al., 2019](#); [Raffaele, S. et al., 2021](#)).
9. Alteración de la reparación del DNA: Las proteínas TDP-43 y FUS funcionan para prevenir o reparar daños relacionados a la transcripción del DNA. FUS repara los rompimientos de dsDNA por ambas vías de recombinación: homóloga y no-homóloga. Otros genes implicados en la reparación del DNA son: *TAF15*, *SETX*, *EWSR1*, *NEK1* y *C21ORF2* ([Mejzini, R. et al., 2019](#); [Hardiman, O. et al., 2017](#)).
10. Defectos en el transporte vesicular: Los genes asociados a esta vía son: *OPTN*, *VAPB*, *CHMPB2* y *UNC13A*. La inhibición prolongada del tráfico vesicular del aparato de Golgi a la membrana plasmática puede llegar a la acumulación de proteínas y fragmentación de Golgi (se considera una característica histopatológica importante en ELA), ésta última es un desencadenante de la neurodegeneración ([Mejzini, R. et al., 2019](#)).

El resultado final es que la neurona no es capaz de mantener sus proyecciones neuronales, conduciendo a la retracción axonal y denervación de la célula diana. Para las NMI la consecuencia es la denervación del músculo y para las NMS hay pérdida del control adecuado de las NMI, hipertonicidad y debilidad (Hardiman, O. et al., 2017). Además, la muerte celular de las neuronas motoras en ELA es similar a la apoptosis dado que hay marcadores bioquímicos que se detectan en ambas vías (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

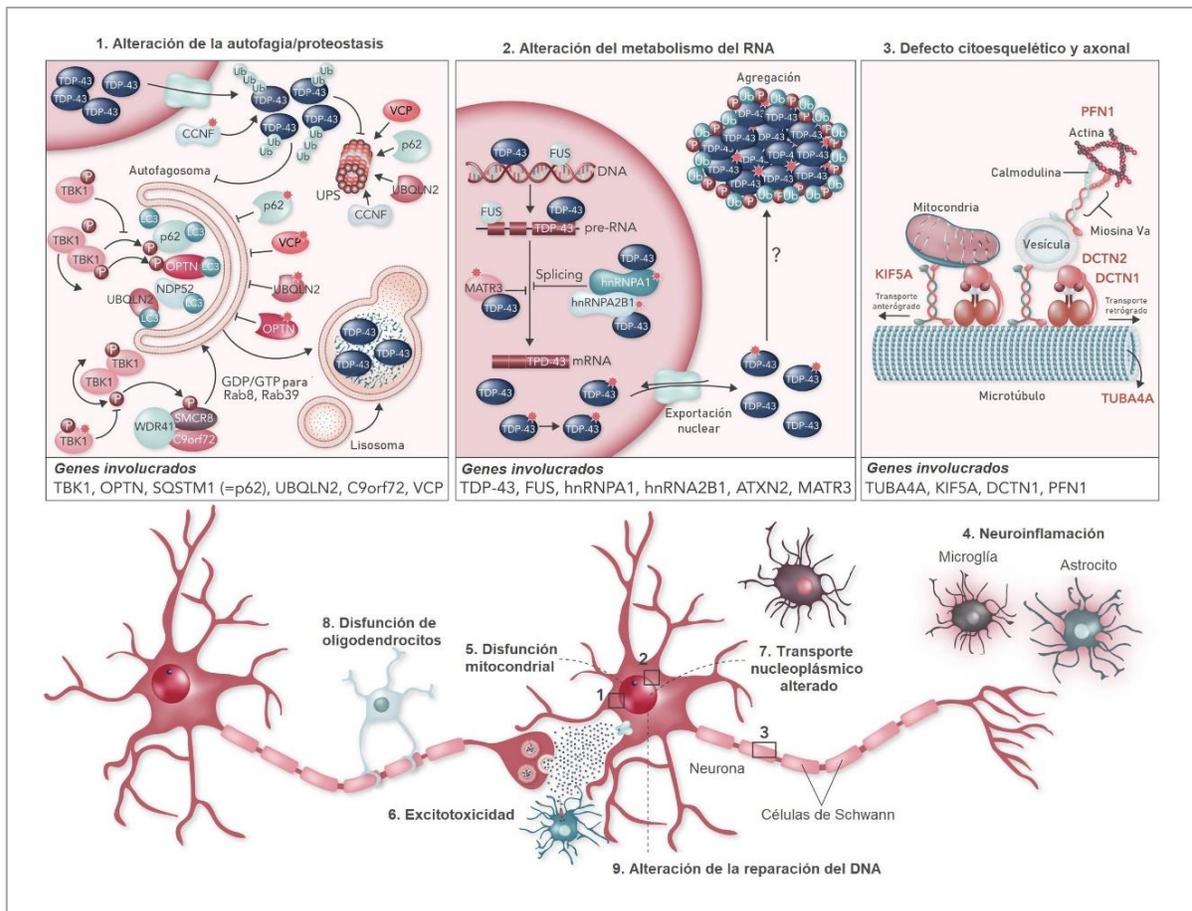


Figura 2. Fisiopatología de la ELA. Nota: Se presentan los principales mecanismos por los cuales se desarrolla la enfermedad. Tomada y modificada de “Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review”, por Masrori, P. y Van Damme, P., 2020, *European Journal of Neurology*, 27(10).

3.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la ELA se basa en la historia clínica, el examen físico, estudios electrofisiológicos y de neuroimagen, estudios genéticos, biomarcadores y en ocasiones biopsia (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020). Las características clínicas de la ELA son la manifestación de signos y síntomas de neurodegeneración de neuronas motoras superiores e inferiores, además de la progresión de los síntomas (Bucheli, M.E. et al., 2012). El inicio es focal, pero la enfermedad se disemina a otras regiones del cuerpo (Van Es, M.A. et al., 2017). Hay síntomas clínicos tempranos comunes que son manifestación de la disfunción/degeneración neuronal en neuronas motoras (Keon, M. et al., 2021), y son:

- Pérdida de coordinación.
- Debilidad muscular.
- Cambios de tono vocal.
- Disartria o dificultad para hablar.
- Calambres y espasmos musculares.
- Risa y llanto incontrolables (ELA pseudobulbar).
- Dificultades respiratorias: falta de aire o molestias al respirar.
- Disfagia o problemas para tragar.
- Debilidad en los músculos del cuello o “síndrome de la cabeza caída”.

Los signos de afectación de NMI son la debilidad muscular, atrofia, fasciculaciones y reducción del tono muscular. Los signos en NMS son hiperreflexia, aumento del tono muscular (espasticidad) y lentitud de movimientos (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020). Como ya se mencionó, dependiendo si el inicio es espinal, bulbar o respiratorio, hay una presentación de síntomas diferente. En el inicio bulbar se presentan disartria, disfagia y labilidad emocional; en el inicio espinal hay atrofia muscular focal que involucra especialmente los músculos de las manos, los antebrazos o los hombros en las extremidades superiores, y el muslo proximal o el músculo distal del pie en las extremidades inferiores; la presentación es asimétrica. Los cambios de comportamiento son comunes (hasta el 40% de los casos), siendo la apatía el síntoma más prevalente. Además, puede presentarse un fenotipo

cognitivo o conductual compatible con la DFT (Hardiman, O. et al., 2017; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

Existen varias herramientas que ayudan al diagnóstico de la enfermedad:

- a) Estudios electrofisiológicos (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009)
 - La electromiografía con aguja concéntrica (EMG) sirve para confirmar la disfunción de las NMI (Masrori, 2020).
 - Estudios de conducción nerviosa para excluir otros trastornos del sistema nervioso periférico.
 - Estimulación magnética transcraneal (TMS) para la evaluación no invasiva de las vías motoras corticoespinales y detección de lesiones de NMS en pacientes sin de signos en NMI.
 - Tiempo de conducción motora central (CMCT), cuyo valor es prolongado en los músculos de al menos una extremidad en la ELA.
 - Estimulación de número de neuronas motoras (MUNE) proporciona una estimación cuantitativa del número de axones que inervan a un músculo.
- b) Estudios neuroimagen (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009; Van Es, M.A. et al., 2017)
 - Resonancia magnética (MRI) de cerebro y médula espinal para descartar lesiones estructurales tratables e identificar lesiones en los tractos corticoespinales en la ELA.
 - Tomografía por emisión de positrones con ^{18}F -fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG-PET) que detecta hipo/hipermetabolismo motor y extra-motor del tronco encefálico y corteza temporal medial.
- c) Pruebas genéticas en los cinco genes más prevalentes que se encuentran mutados en ELA: *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72* y *TBK1* (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020).
- d) Biomarcadores (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009)
 - Niveles de neurofilamentos en LCR.

- Enzimas musculares: creatinina quinasa sérica, ALT, AST, LDH.
 - Hipocloremia y aumento de bicarbonato, asociados con un compromiso respiratorio avanzado.
- e) Biopsia muscular: Se usa para demostrar la disfunción de NMI cuando los hallazgos clínicos o electrofisiológicos no lo apoyan o para descartar algún síndrome mímico (Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

El criterio diagnóstico empleando la escala de El Escorial (revisado) clasifica a la enfermedad de acuerdo con la evidencia neurológica en 4 regiones: tronco encefálico, cervical, torácica y lumbosacra (Tabla 2).

Tabla 2. Criterio El Escorial para diagnóstico de la ELA.

Requisitos	Presencia de: <ul style="list-style-type: none"> a) Evidencia de degeneración de NMI por examinación clínica, electrofisiopatológica o neuropatológica. b) Evidencia de degeneración de NMS por examen clínico. c) Expansión progresiva de síntomas y signos hacia una o más regiones. Ausencia de: <ul style="list-style-type: none"> a) Evidencia electrofisiológica y patológica de otros procesos patológicos que podría explicar los signos de degeneración de las NMS o NMI. b) Evidencia de neuroimagen de otros procesos patológicos que podrían explicar los signos clínicos y electrofisiológicos. 	
	Categorías de diagnóstico	ELA clínicamente definida
ELA clínicamente probable		Evidencia clínica de signos de neuronas motoras superiores e inferiores en al menos dos regiones con algunos signos de NMS rostrales a los signos de neuronas motoras inferiores.
ELA clínicamente probable -apoyada en laboratorio		Signos clínicos de disfunción de la motoneurona superior e inferior en una sola región, o signos de la NMS solos en una región con signos de la NMI definidos por criterios de electromiografía en al menos dos extremidades, junto con una aplicación adecuada de protocolos de laboratorio clínico y de neuroimagen para excluir otras causas.
ELA posible		Signos clínicos de disfunción de la neurona motora superior e inferior en una sola región, o signos de la NMS solos en dos o más regiones; o signos de la NMI rostrales a los signos de la NMS y no se puede probar el diagnóstico de ELA respaldada por laboratorio clínicamente probable.

Nota: Se muestran los requisitos y las categorías de diagnóstico de la ELA de acuerdo con el criterio “El Escorial Revisado” en el centro de conferencias de Airlie (1998) por el Comité de Investigación en Neurología de Enfermedades de las Neuronas Motoras. Tomada y modificada de “Amyotrophic lateral sclerosis”, por Hardiman, O. et al., 2017, *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1).

En pacientes con presentaciones muy tempranas de la enfermedad, de progresión lenta o con trastornos del sistema nervioso central o periférico, el diagnóstico se torna desafiante puesto que existe la posibilidad de un diagnóstico con “síndromes que imitan la ELA” en un 7-8% de los casos. Algunos ejemplos de enfermedades parecidas a la ELA son mielopatía cervical, miastenia gravis, neuropatía motora multifocal, entre otras (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Hardiman, O. et al., 2017).

Una herramienta para evaluar la evolución de la enfermedad es la Escala Revisada de Calificación Funcional de ELA (ALS-FRS-R) y es un instrumento validado que monitorea la progresión de la discapacidad en pacientes con el padecimiento (Cedarbaum, J.M., et al., 1999).

El pronóstico para pacientes con ELA es muy variable. Sin embargo, se conocen que hay ciertos factores asociados con una supervivencia más corta, por ejemplo: inicio bulbar, retraso en el diagnóstico, pérdida pronunciada de peso, presencia de DFT, inicio con una edad avanzada y factores genéticos (mutación Ala5Val en *SOD1*, expansión de repetidos en *C9ORF72* o mutación P525L en *FUS*) (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020).

3.1.7 Tratamiento

Los pacientes con ELA requieren una atención multidisciplinaria en donde se incluyen en personal de salud médicos especialistas, fisioterapeutas, trabajadores sociales, neurólogas, dietistas, entre otros (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N., 2009).

Varios síntomas de ELA se pueden tratar con tratamiento farmacológico y no farmacológico (Tabla 3). Asimismo, hay tratamientos que modifican la enfermedad. El fármaco con más disponibilidad es el riluzol el cual prolonga la supervivencia del paciente, ya que posee efectos antiglutamatérgicos. Otro medicamento recientemente aprobado es la edavorona cuya función es la disminución de estrés oxidativo (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020).

Tabla 3. Tratamiento farmacológico y no farmacológico para síntomas de ELA.

SÍNTOMAS	TRATAMIENTO	
	Farmacológico	No farmacológico
Calambres	Carbamazepina, fenitoína, quinina, levetiracetam.	Fisioterapia, ejercicio físico, masajes.
Espasticidad	Baclofeno, tizanidina,	Fisioterapia, hidroterapia,
Sialorrea (hipersalivación)	Atropina, hioscina, glicopirrolato, amitriptilina, toxina botulínica.	Nebulización
Dolor	Gabapentina, pregabalina, AINEs, opioides y cannabis.	Mejorar la comodidad del paciente
Disartria	N/A	Terapia del lenguaje, amplificadores de voz, técnicas de comunicación basadas en interfaces cerebro-computadora.
Depresión	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI) o antidepresivos tricíclicos	Apoyo psicológico
Ansiedad	Ansiolíticos: Lorazepam	Apoyo psicológico
Disfagia	N/A	Cambios en la dieta, ejercicios de deglución.
Insuficiencia respiratoria	N/A	Ventilación no invasiva o ventilación invasiva mediante traqueotomía.

Nota: Tomada y modificada de “Amyotrophic lateral sclerosis”, por Hardiman, O. et al., 2017, *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1) y “Amyotrophic lateral sclerosis”, por Wijesekera, L.C. y Leigh, P.N, 2009, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(3).

Actualmente se están desarrollando otros tratamientos innovadores como los RNA pequeños de interferencia (siRNA), oligonucleótidos antisentido (AO), uso de virus adenoasociados (AAV) para la introducción de diversas moléculas (como AO) o terapias basadas en células madre (Mejzini, R. et al., 2019; Brown, R.H. y Al-Chalabi, A., 2017; Oskarson, B. et al., 2018).

3.1.8 Espectro ELA/DFT

Se denomina demencia frontotemporal (DFT) al grupo de trastornos neurodegenerativos causado por alteraciones patológicas localizadas en los lóbulos

frontal y temporal que desencadenan la disfunción progresiva del funcionamiento ejecutivo, lenguaje y comportamiento (Young, J.J. et al., 2017; Rodríguez-Leyva, I. et al., 2019). El término degeneración lobar frontotemporal (DLFT) es usado para aquellos casos donde los pacientes presentan clínicamente el trastorno y cuentan con evidencia genética o histopatológica de DFT (Rodríguez-Leyva, I. et al., 2019).

Es la segunda forma más común de demencia en personas menores de 65 años y la tercera en mayores de 65 años (Khan, I. y De Jesus, O., 2021). La incidencia es de 1.61-4.1/100,000 hab. por año y la prevalencia es de 15-22/100,000 hab. (Olney, N.T. et al., 2017; Khan, I. y De Jesús, O., 2021). La edad promedio de aparición es entre los 45 y 65 años, aunque se han documentado casos en menores de 30 años y ancianos (Olney, N.T. et al., 2017). La sobrevivencia promedio es de 8 a 10 años después del inicio de la enfermedad (Wen, X. et al., 2017).

Al igual que la ELA, la DFT se clasifica como esporádica (DFTs) y familiar (DFTf) sin embargo, ésta última abarca hasta el 40% de los casos totales (Khan, I. y De Jesus, O., 2021).

Tras hallazgos clínicos, patológicos y genéticos se sabe que la ELA y la DFT son parte del mismo espectro clínico-patológico. Aunque ambas tienen características clínicas diferentes, se han encontrado que las dos enfermedades ocurren en la misma familia o simultáneamente en el mismo paciente. De hecho, alrededor el 15% de los pacientes con ELA desarrollan DFT y del 12.5 a 14% de pacientes con DFT tienen una enfermedad neuromotora. Por esta superposición y relación entre las dos patologías, se le describe como espectro ELA/DFT (Wen, X. et al., 2017; Casterton, R.L. et al., 2020; Masrori, P. y Van Damme, P., 2020).

3.1.8.1 Variantes de demencia frontotemporal

La demencia frontotemporal se puede clasificar clínicamente en cuatro categorías, dependiendo si hay un deterioro en la conducta o en el lenguaje (Tabla 4). Cada una tiene características clínicas diferentes, pero conforme la enfermedad avanza es posible el traslape entre ellas (Rodríguez-Leyva, I. et al., 2019).

Tabla 4. Variantes clínicas de DFT.

Variante fenotípica		Descripción
Conductual (bvDFT)		Cambios de comportamiento o personalidad: desinhibición, pérdida de reactividad emocional y percepción de la enfermedad, apatía, pensamiento abstracto deteriorado, función ejecutiva que empeora progresivamente y pérdida de emociones fundamentales. Se conserva la memoria.
Afasia progresiva primaria (PPA)	No fluente agramatical (nfvPPA)	Presentación de habla interrumpida por el esfuerzo y parafasia (palabras desordenadas), dificultad para comprender oraciones complejas y nombrar objetos. La memoria, pensamiento abstracto y capacidad de cálculo son conservadas al principio de la enfermedad.
	Semántica (svPPA)	Dificultades en el lenguaje: afasia (pérdida de vocabulario o dificultad para encontrar las palabras), dificultad para encontrar el significado de las palabras, comprensión alteradas y dificultad para reconocer caras u objetos desconocidos. El habla es fluida, pero carece de sentido. La memoria es afectada al final de la enfermedad.
	Logopénica (lvPPA)	Deterioro del lenguaje en la nomenclatura y sintaxis de las oraciones. El habla es interrumpida con “sonidos de relleno”, afasia, pausas frecuentes, errores fonológicos y en la repetición de oraciones mal formadas.

Nota: Se muestran las variantes fenotípicas de DFT con su descripción. Tomada y modificada de “Frontotemporal Lobe Dementia”, por Khan. I y De Jesús, O., 2021, *StatPearls*, “Frontotemporal dementia: latest evidence and clinical implications”, por Young, J.J. et al., 2017, *Therapeutic Advances in Pshycopharmacology*, 8(1) y “Demencia frontotemporal: revisión y nuestro punto de vista”, por Rodríguez-Leyva, I. et al., 2018, *Revista Mexicana de Neurociencia*, 19(6).

De igual manera, se puede dividir a la DLFT de acuerdo con sus características histopatológicas (Sun, L. y Eriksen, J.L., 2011 Young, J.J. et al., 2017), dependiendo del tipo de inclusiones que se presenten:

- a) DLFT-tau: inclusiones de proteína tau (gen *MAPT*).
- b) DLFT-TDP: inclusiones de proteína TDP-43 (genes *TARDBP* y *GRN*).
- c) DLFT-UPS: inclusiones con proteína desconocida (gen *CHMP2B*).
- d) DLFT-FUS o DFLT FET: inclusiones con proteína FUS, EWSR1 o TAF15 (genes *FUS*, *EWSR1* o *TAF15*).
- e) DLFT-ni: sin inclusiones.

Por último, el espectro ELA/DFT se clasifica en subgrupos de acuerdo con los déficits neuropsicológicos (Van Es, M.A. et al., 2017; Babić Leko, M. et al., 2019).

- a) ELA/DFT: ELA con bvDFT, nvPPA, svPPA o lvPPA.
- b) ELA-bi: ELA con cambios de comportamiento.
- c) ELA-eci: ELA con evidencia de disfunción ejecutiva.
- d) ELA-neci: ELA sin disfunción ejecutiva, pero deterioro en otros dominios cognitivos.
- e) ELA-ci: ELA con deterioro cognitivo.
- f) ELA-cbi: ELA con deterioro cognitivo y conductual combinado.
- g) DFT-ENM: Diagnóstico primario de DFT con evidencia neuropatológica de degeneración en motoneuronas.

3.1.8.2 Neuropatología de DFT y genes asociados.

Existen más de 10 genes asociados al desarrollo de DFT (Tabla 5), siendo los más frecuentes *MAPT*, *GRN* y *C9ORF72* (Olney, N.T. et al., 2017).

Tabla 5. Principales genes asociados al desarrollo de DFT.

Gen	Locus	Proteína codificada	Función
MAPT	17q21.32	Tau asociada a microtúbulos	Transporte, estructura y señalización celular
GRN	17q21.32	Progranulina	Crecimiento celular, función lisosomal e inflamación
C9ORF72	9p21.2	C9orf72	Autofagia, metabolismo de RNA
TARDBP	1p36.2	TDP-43	Metabolismo de RNA
FUS	16p11.2	FUS	Metabolismo de RNA
CHCHD10	22q11.23	CHCHD10	Estabilidad e integridad mitocondrial
UBQLN2	Xp11.21	Ubiquilina 2	Degradación proteica
TBK1	12q14.1	TBK1	Autofagia
SQSTM1	5q35	SQSTM1/P62	Autofagia
VCP	9p13	VCP	Degradación proteica y fusión membranal
CHMP2B	3p11	CHMP2B	Endocitosis y tráfico de proteínas

Nota: Se muestran algunos genes y proteínas relacionadas con el desarrollo de DFT. Tomada y modificada de “The Overlapping Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia”, por Abramzon, Y.A. et al., 2020, *Frontiers in Neuroscience*, 14.

El mecanismo patológico de la DFT es el depósito intracelular de agregados de proteínas de manera anormal en los lóbulos frontal y temporal que causan la degeneración de neuronas, formación de microvacuolas y astrocitosis. Por ello, la DLFT puede clasificarse dependiendo de los componentes celulares de las

inclusiones celulares (Sivasathiaseelan, H. et al., 2019; Khan, I. y De Jesus, O., 2021).

Asimismo, la DFT y la ELA comparten algunos mecanismos que llevan a la neurodegeneración: disfunción mitocondrial, alteración en la proteostasis, defectos en el procesamiento de RNA, autofagia y tráfico vesicular (Abramzon, Y.A. et al., 2020). No es sorprendente ver que varios genes (*TARDBP*, *C9ORF72*, etc.) están implicados en ambas patologías, confirmando el espectro ELA/DFT (Figura 3).

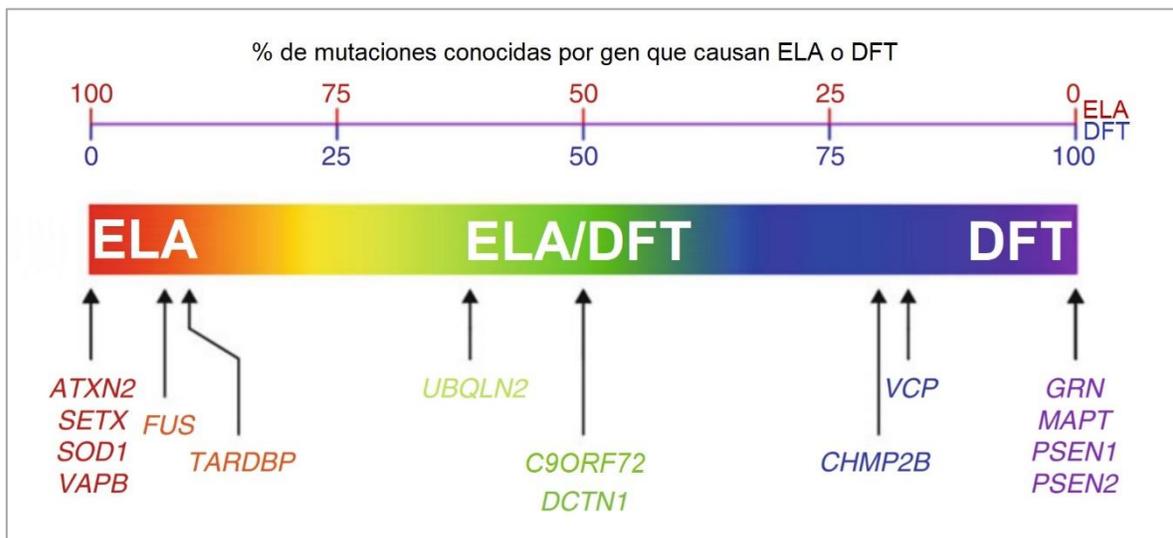


Figura 3. Genes asociados al espectro ELA/DFT. Nota: Se presentan algunos genes involucrados en ELA, DFT y ELA/DFT con su porcentaje de variantes patológicas. Tomada y modificada de “Genetics of ALS” (p.388), por McLaughlin, R.L. et al., 2015, *Movement Disorder Genetics*.

3.1.8.3 Diagnóstico y tratamiento.

Para el diagnóstico de la DFT se utilizan las siguientes herramientas:

- Pruebas de laboratorio: Biomarcadores (neurofilamento de cadena liviana) y pruebas genéticas (Van Es, M.A. et al., 2017; Khan, I. y De Jesus, O., 2021).
- Estudios de neuroimagen: Resonancia magnética de cerebro y ¹⁸F-FDG-PET (Masrori, P. y Van Damme, P., 2020; Rodríguez-Leyva, I. et al., 2019; Khan, I. y De Jesus, O., 2021).

- c) Exámenes neurocognitivos: Mini-examen del estado mental (MMSE) que evalúa memoria, cognición, lenguaje, atención/orientación y las funciones ejecutivas (Khan, I. y De Jesus, O., 2021).

Dado que hay pruebas neuropsicológicas convencionales que dependen de la capacidad de hablar y escribir, puede que no sean adecuadas para un paciente con ELA. Por ello ya existen varias herramientas diseñadas para los pacientes ELA/DFT, por ejemplo, la Evaluación Cognitiva Breve ELA (ALS-BCA), la Evaluación Cognitiva Conductual ELA (ALS-CBS), Cuestionario ELA/DFT (ALS-FTD-Q) y la Evaluación de ELA Cognitiva y Conductual de Edimburgo (ECAS) (Van Es, M.A. et al., 2017).

El tratamiento para la DFT es meramente sintomático donde las intervenciones no farmacológicas son las opciones más viables dada la falta de un tratamiento farmacológico efectivo (Rodríguez-Leyva, I. et al., 2019).

- a) Tratamiento no farmacológico: enfoque ambiental (reducir ruido, limitar sobreestimulación, eliminar actividades diarias complicadas, etc.) y la introducción de pasatiempos (Rodríguez-Leyva, I. et al., 2019).
- b) Tratamiento farmacológico: Los inhibidores de la recaptura de la serotonina pueden mejorar la conducta, desinhibición o irritabilidad, pero no tienen efecto en síntomas cognitivos. Los antagonistas dopaminérgicos selectivos pueden mejorar la motivación y apatía. Clomipramina y carbamazepina para conductas compulsivas. Actualmente, se encuentran en ensayos clínicos varios fármacos modificadores de la enfermedad (Rodríguez-Leyva, I. et al., 2019; Khan, I. y De Jesús, O., 2021).

3.2 Gen *C9ORF72*

Uno de los principales genes asociados al desarrollo de ELA y ELA/DFT es el *C9ORF72*.

El gen *C9ORF72* o subunidad compleja C9orf72-SMCR8, anteriormente llamado marco abierto de lectura 72 cromosoma 9 (HUGO Gene Nomenclature Committee [HGNC], 2020), se localiza en la región cromosómica 9p21.2. Este gen está conformado por 12 exones los cuales codifican para 3 variantes transcripcionales y

dos isoformas de proteínas (Figura 4). Los exones del gen han sido determinados como 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Souza, P. et al., 2015).

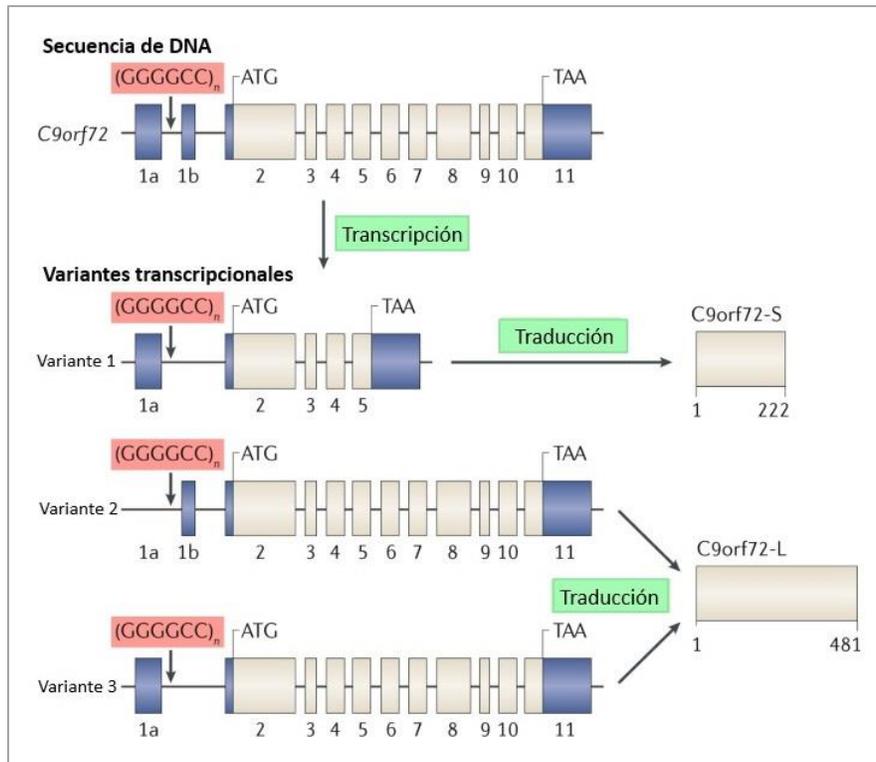


Figura 4. Estructura del gen *C9ORF72*, sus variantes transcripcionales producidas por *splicing* alternativo e isoformas de proteínas para las que codifica. Nota: Los exones codificantes se representan en color blanco y los no-codificantes en color azul, así como el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (TAA); se indica con color rojo la localización del hexanucleótido repetido G₄C₂ para cada transcrito. Tomada y modificada de "C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease" (p.31), por Balendra, R. e Isaacs, A., 2018, *Nature Reviews Neurology*, 14(9).

Las variantes transcripcionales difieren entre sí dependiendo del sitio donde inicia la transcripción y los exones codificantes involucrados. La variante 1 inicia en el exón 1a y los exones codificantes son del 2 al 5, los cuales al traducirse generan una proteína de 222 aminoácidos denominada C9orf72-S (short), C9-S o isoforma b. Por otra parte, la variante 2 inicia en el exón 1b y la variante 3 en el exón 1a; ambas involucran como exones codificantes del 2 al 11, los cuales se traducen en una proteína más larga de 481 aminoácidos conocida como C9orf72-L (long), C9-L

o isoforma a (Balendra, R. e Isaacs, A.M., 2018; Xiao, S. et al., 2015; National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2021).

De manera general, los transcritos de *C9ORF72* se han encontrado en todos los tejidos, pero son mayormente expresados en riñón, pulmón, hígado, corazón, testículo y cerebelo (The Human Protein Atlas, 2021; UniProt, 2021). La variante transcripcional 1 está principalmente expresada en testículos, cerebro fetal, cerebelo y corteza frontal (Souza, P. et al., 2015). La variante 3 se encuentra mayormente en cerebro, cerebelo, ovario, pulmón y en las trompas de Falopio (University of California Santa Cruz [UCSC], 2019). Y la variante 2 se ha reportado que se expresa en niveles más altos que las variantes 1 y 3 en los tejidos del sistema nervioso central (SNC) (Balendra, R. e Isaacs, A.M., 2018).

Se ha observado que el gen *C9ORF72* es altamente conservado entre los metazoos (organismos eucariotas pluricelulares) a excepción de *Drosophila melanogaster*. Cuando se comparan las regiones codificantes del gen humano *C9ORF72* con sus ortólogos, se encuentra una alta similitud a nivel de secuencia de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, con el ratón hay una similitud del 91.89% en nucleótidos (nt) y 98.75% en aminoácidos (aa); con la rata 89.4% nt y 97.71% aa; con la gallina 83.3% nt, 93.56% aa; y con el pez zebra 68.55% nt, 76.14% aa. Este alto grado de homología sugiere que el gen *C9ORF72* podría tener funciones biológicas fundamentales (Xiao, S. et al., 2016).

3.3 Proteína C9orf72

3.3.1 Estructura de la proteína

La proteína C9orf72, cuyo nombre oficial es proteína C9orf72 de intercambio de nucleótidos de guanina (*Guanine nucleotide exchange C9orf72 protein*), tiene 2 isoformas: la isoforma larga C9-L (481 aa, 54 kDa) y la isoforma corta C9-S (222 aa, 24kDa) (Xiao, S. et al., 2015).

En su estructura secundaria, la isoforma C9-L contiene 16 α -hélices y 15 láminas β , mientras que la isoforma C9-S tiene aproximadamente 8 α -hélices y 10 láminas β

(UniProt, 2021; The Phyre2 web portal for protein modeling, 2015). La estructura terciaria de ambas isoformas se muestra en la Figura 5.

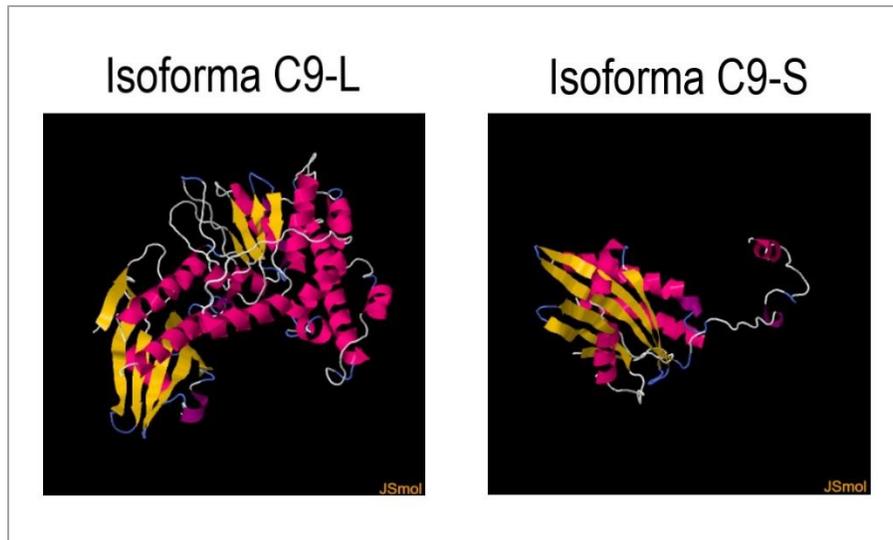


Figura 5. Estructura terciaria de las isoformas C9-L y C9-S de la proteína C9orf72 de intercambio de nucleótidos de guanina. Nota: Se muestra en color rosado las α -hélices y en amarillo las láminas β . Tomada y modificada de la plataforma *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*, de Kelley L.A. et al., 2015, (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Actualmente aún se están estudiando las modificaciones post-traduccionales que sufre la proteína, solo se han confirmado la fosforilación en el sitio S9 y la ubiquitinación en K388, lógicamente la isoforma C9-L tiene modificaciones en estos 2 sitios y la proteína C9-S solo en S9. También faltan más estudios para confirmar una fosforilación en T440 (iPTMnet, 2021; ActiveDriverDM'21, 2021; PhosphoSitePlus, 2019).

3.3.2 Localización subcelular y celular

La isoforma C9-L se ha encontrado de manera difusa y granular en el citoplasma del soma y neuritas de neuronas motoras; de igual manera se encontró en células de Purkinje: de manera difusa en el citoplasma y en forma de manchas en sus dendritas. La isoforma C9-S se ha localizado puntualmente en la membrana nuclear

de neuronas motoras y células de Purkinje, y difusamente en el núcleo de neuronas motoras (Xiao, S. et al., 2015). Se ha encontrado que la isoforma C9-L está predominantemente expresada en regiones presinápticas de cerebro humano (Frick, P. et al., 2018).

Ambas isoformas se han distribuido en vesículas citoplásmicas como endosomas, lisosomas y otras vesículas relacionadas con autofagia (Braems, E. et al., 2020; Farg, M.A. et al., 2014; Shi, Y. et al., 2018).

3.3.3 Expresión de la proteína en los tejidos

La proteína C9orf72 se expresa altamente en células mononucleares de sangre periférica, testículo, ovario, duodeno, intestino delgado, colon, riñón, próstata. Otros tejidos donde también se ha encontrada expresada la proteína, pero en menor cantidad, son: la glándula tiroidea, glándula suprarrenal, bronquios, pulmón, estómago, recto, vesícula biliar, epidídimo, cérvix, placenta, músculo cardiaco, músculo esquelético, apéndice, bazo, ganglios linfáticos, anginas y médula ósea, corteza cerebral, hipocampo, núcleo caudado, mucosa oral, glándulas salivares, hígado, páncreas, vesícula seminal, trompas de Falopio, endometrio, pecho, tejido blando, tejido adiposo y piel (Gene Cards, 2021; The Human Protein Atlas, 2021). Adicionalmente también se ha encontrado en la corteza frontal (UniProt, 2021).

3.3.4 Funciones de la proteína

3.3.4.1 Función en el tráfico membranar.

El tráfico membranar es un concepto que abarca una amplia variedad de procesos que intervienen en el movimiento de “carga” (proteínas, patógenos y otras moléculas) por medio de vesículas de transporte a través de una membrana. Este proceso ocurre dentro de los diferentes organelos de una misma célula o a través de la membrana celular hacia el ambiente extracelular o desde este mismo. En este transporte de moléculas, la célula cuenta con un sistema complejo y altamente regulado con el fin de asegurar especificidad (MBI, 2018).

Las funciones específicas del tráfico membranal en las neuronas son: la regulación de la composición de proteínas y organelos en dendritas y axones, la transmisión sináptica y la distribución correcta de diversos receptores de superficie. Conociendo estas funciones, no es difícil suponer que prácticamente el tráfico membranal está involucrado en todos los aspectos de la función neuronal, particularmente en el mantenimiento y la degeneración neuronal (Kiral, F.R. et al., 2018).

Las Rab GTPasas son la rama de proteínas más grande de la superfamilia Ras cuya función principal es la organización del tráfico membranal intracelular. Estas proteínas están presentes en todas las células eucariotas y se encargan de mediar procesos fundamentales de clasificación de vesículas y su transporte entre membranas. Existen más de 60 Rab GTPasas que son codificadas por el genoma humano, 24 de estas son específicas o enriquecidas en el SNC. Al igual que otras pequeñas GTPasas, las proteínas Rab pueden estar es estado activo o inactivos a través de la unión de GTP o GDP en sus regiones interruptoras (Figura 6) (Kiral, F.R. et al., 2018). El cambio entre estas dos conformaciones se realiza de la siguiente manera:

a) Cambio de GDP a GTP

Cuando las proteínas Rab están unidas a GDP están en un estado inactivo. Su afinidad por el GDP es alta y su velocidad de disociación es lenta, así necesitan al “factor de intercambio de nucleótidos de guanina” (GEF, por sus siglas en inglés) para desplazar eficientemente al GDP y permitir la unión al GTP para pasar a un estado activo. Una proteína Rab activa se puede unir a moléculas efectoras que promueven el tráfico de vesículas (Bos, J.L., et al., 2007; Wang, S. et al., 2017).

b) Cambio de GTP a GDP

Las proteínas Rab tienen una actividad intrínseca de hidrolizar al GTP a GDP, empero este proceso es lento y necesitan de una “proteína activadora de GTPasa” (GAP, por sus siglas en inglés) para pasar de un estado activo a un estado inactivo de manera más eficiente (Bos, J.L., et al., 2007).

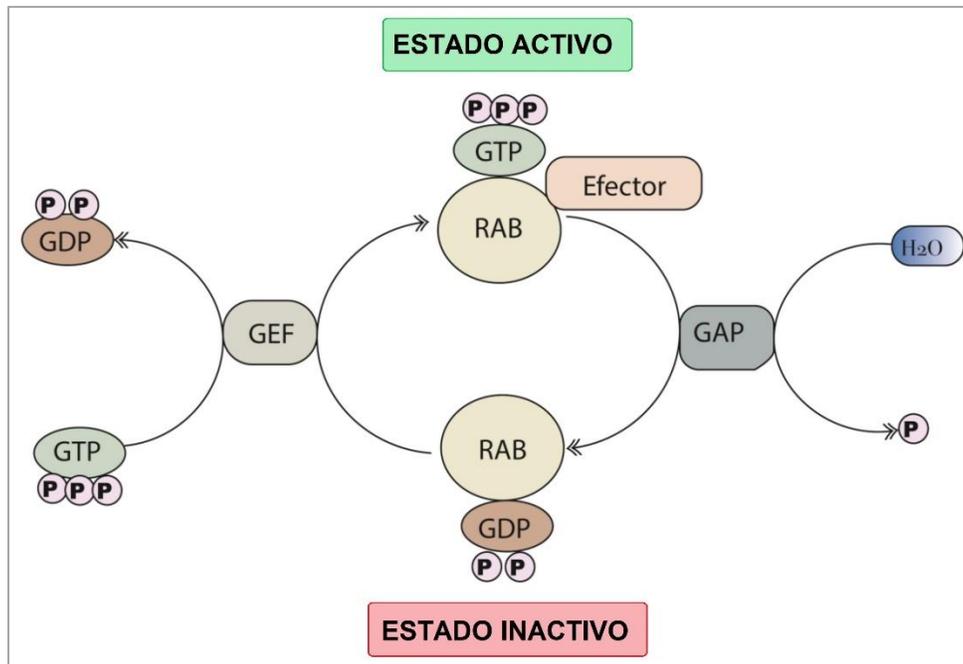


Figura 6. Ciclo de las Rab GTPasas. Nota: Las proteínas Rab oscilan entre dos conformaciones: un estado activo (unido a GTP) y uno inactivo (unido a GDP). Dichos estados son promovidos por un GEF que cataliza la conversión de unión de GDP a GTP, y por un GAP que hidroliza al GTP para formar GDP. Las proteínas Rab activas promueven una cascada de señalización a través de su interacción con proteínas efectoras. Tomada y modificada de “Rab GTPases: Emerging Oncogenes and Tumor Suppressive Regulators for the Editing of Survival Pathways in Cancer”, por Gopal Krishnan, P.D., et al., 2020, *Cancers*, 14(2), 259.

C9orf72 cuenta con un dominio DENN (Expresado Diferencialmente en Células Normales y Neoplásicas) que se ha estudiado como un dominio que funciona enzimáticamente como un GEF y así interactúa con algunas RabGTPasas. Por tanto, se infiere que la proteína C9orf72 actúa como GEF con distintas proteínas Rab para regular el tráfico membranar. De igual manera, se ha demostrado *in vitro* que C9orf72 también puede actuar como GAP con otras proteínas Rab (Nassif, M. et al., 2017; Marat, A.L., 2011; Tang, B.L., 2016; Tang, D. et al., 2020a).

En 2016 se publicó en la revista *EMBO Journal* un nuevo complejo proteico que involucra a las proteínas C9orf72, SMCR8, y WDR41 (Sellier, C. et al., 2016; Almeida, S. y Gao, F., 2016). La proteína SMCR8 (Región cromosómica del síndrome de Smith-Magenis, candidato 8) tiene también un dominio DENN y con

ello se predice que funciona como GEF (Tang, B.L., 2016; Almeida, S. y Gao, F., 2016). Por otro lado, WDR41 (Proteína que contiene repeticiones WD 41) por sí sola no tiene una función en específico, pero cuando se encuentra junto con C9orf72 y SMCR8 funciona para localizar al complejo en el lisosoma en condiciones de inanición (Braems, E. et al., 2020; Pang, W. y Hu, F., 2020). La estructura del complejo C9ORF72-SMCR8-WDR41, referido de aquí en adelante como complejo CSW, por medio de microscopía crioelectrónica (cryo-EM) ha sido elucidada como dímero de heterotrímeros CSW, en el cual SMCR8 se une a C9orf72 (C9-L) y a WDR41, estas dos últimas proteínas no tienen una interacción directa. La región C-terminal de C9orf72 y el dominio DENN de SMCR son necesarios para la dimerización del complejo CSW (Figura 7) (Tang, D. et al 2020b; Pang W. y Hu, F., 2020).

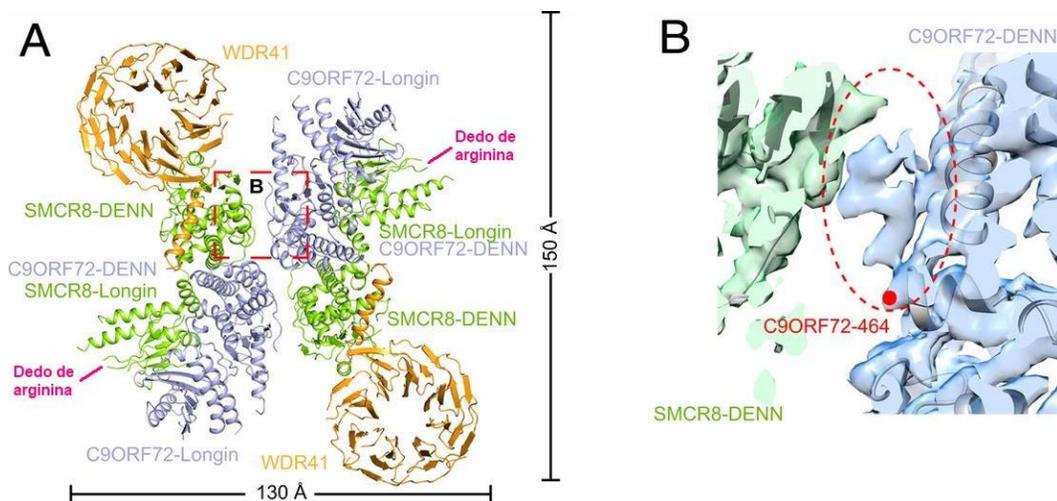


Figura 7. Estructura del complejo C9orf72-SMCR8-WDR41. Nota: A) Se muestra la estructura general y tamaño del complejo CSW, así como sus dominios DENN, Longin y dedos de arginina. Las proteínas C9orf72, SMCR8 y WDR41 se muestran en colores azul, verde y naranja, respectivamente. B) Interfaz entre el dominio DENN de SMCR8 y la región C-terminal de C9orf72, esta interacción media la dimerización de los dos protómeros del complejo CSW. Tomada y modificada de “Cryo-EM structure of C9ORF72–SMCR8–WDR41 reveals the role as a GAP for Rab8a and Rab11a”, por Tang, D. et al., 2020a, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(18).

El complejo CSW al tener 2 proteínas con dominio DENN ha sido descrito como un complejo GEF para ciertas proteínas Rab, demostrando cierto grado de

especificidad (Nassif, M, 2017; Almeida, S. y Gao, F., 2016). Una vez que el complejo activa a las Rab GTPasas, se reclutan proteínas efectoras río debajo las cuales pueden ser GEFs y GAPs para otras proteínas Rab, proteínas de unión que facilitan la fusión de vesículas y muchas otras (Pang, L. y Hu, F., 2020).

Al estudiar con más profundidad al complejo CSW se ha encontrado que la proteína SMCR posee un residuo de dedo de arginina R147, confiriéndole al complejo actividad como GAP para pequeñas GTPasas, como las Rag GTPasas y las Arf GTPasas, miembros de la superfamilia Ras (Pang, L. y Hu, F., 2020). CSW también puede funcionar como un complejo efector en la autofagia. Asimismo, interactúa con otras proteínas como p62 y optineurina (Pang, L. y Hu, F., 2020; Almeida, S. y Gao, F., 2016). En la Tabla 6 se ilustran las funciones del complejo CSW con distintas GTPasas.

Tabla 6. Interacción del complejo CSW con pequeñas GTPasas.

GTPasa	Complejo CSW funciona como:			Vía involucrada
	GEF	GAP	Efector	
Rab1a			✓	Iniciación de autofagia
Rab3	✓			Sinapsis
Rab5	✓			Endocitosis (endosoma temprano). Autofagia
Rab7	✓			Endocitosis (endosoma tardía). Autofagia
Rab8a*	✓	✓		Autofagia
Rab11a*	✓	✓		Endocitosis (reciclaje endosomal). Autofagia y sinapsis
Rab39b	✓			Autofagia
Arf1		✓		Tráfico membranal en aparato de Golgi. Vía de señalización de mTORC1
Arf6		✓		Tráfico membranal durante endocitosis Autofagia/ Modulación de la inflamación
Rag*	¿?	¿?	¿?	Vía de señalización mTORC1/ Autofagia

Nota: *Resultados inconsistentes entre diversos grupos de estudio, se requiere más investigación. Tabla tomada y modificada de “Cellular and physiological functions of C9ORF72 and implications for ALS/FTD”, por Pang, W. y Hu, F., 2020, Journal of Neurochemistry, 157(3).

3.3.4.1.1 Endocitosis.

La endocitosis es un mecanismo que tiene la célula para incorporar grandes cantidades de moléculas extracelulares de forma masiva. Dichas moléculas son englobadas por una parte de membrana plasmática que se va cerrando hasta formar vesículas. Este proceso sirve para la degradación de las moléculas captadas, además también funciona para el reciclaje de moléculas que se encuentran en la membrana plasmática y funciona para compensar procesos de exocitosis. Posteriormente esas vesículas se fusionan con compartimentos internos como los llamados endosomas, los cuales se clasifican como tempranos, tardíos o cuerpos multivesiculares; dependiendo de su función son una estación de llegada, clasificación y reparto de moléculas que se comunica con otros compartimentos de la célula como el lisosoma o el aparato de Golgi (Megías, M. et al., 2021).

Respecto a la función de C9orf72 en endocitosis, estudios realizados en líneas celulares neuronales han probado que esta proteína se co-localiza con Rab5, Rab7 y Rab11, las cuales se asocian al endosoma temprano, endosoma tardío y reciclaje endosomal, respectivamente (Farg, M.A. et al., 2014; Shi, M. et al, 2017). De hecho, la asociación C9orf72 a Rab5 puede facilitar el papel de esta GTPasa en el tráfico vesicular y la maduración del endosoma temprano para incrementar la supervivencia neuronal (Shi, Y. et al 2018; Zeigerer, A., et al. 2012; Braems, E. et al., 2020).

3.3.4.1.2 Macroautofagia.

La macroautofagia es un proceso en el que una vesícula de doble membrana (autofagosoma) envuelve a una carga o sustrato citosólico (proteínas mal plegadas, organelos dañados, etc.) para después fusionarse con el lisosoma y así permitir su degradación y reciclaje. Ciertos autofagosomas se pueden fusionar con endosomas antes de llegar al lisosoma, a estas vesículas intermedias se les denomina “anfisosomas” y es un indicio de cómo la macroautofagia está conectada con otros procesos celulares (Nassif, M. et al., 2017; Webster, C.P. et al., 2016). El proceso

cuenta con 4 etapas (Webster, C.P. et al., 2016) (Figura 8) y son: a) translocación e iniciación, b) elongación y reclutamiento de la carga, c) compleción/ maduración y cierre y d) fusión con el lisosoma y degradación.

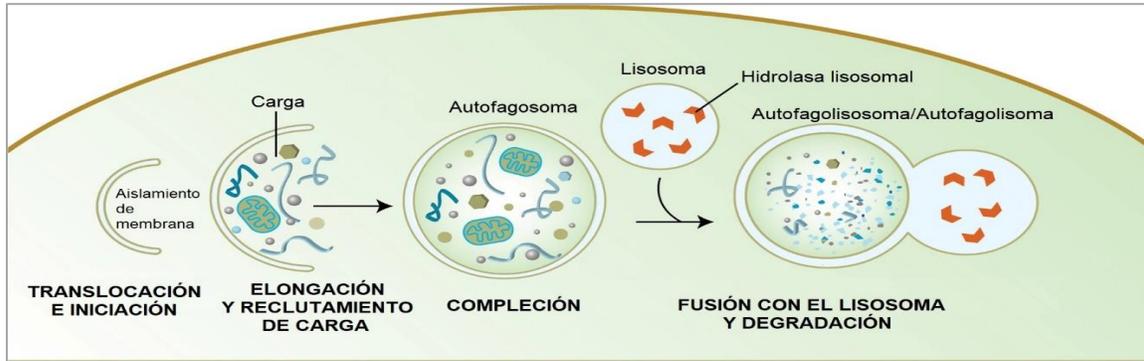


Figura 8. Etapas de la macroautofagia. Nota: La autofagia inicia con el aislamiento de doble membrana, la cual se va elongando para poder rodear a la carga (organelos y proteínas), posteriormente se forma el autofagosoma mediante su maduración y cierre (compleción) y finalmente se fusiona con el lisosoma para constituir una estructura conocida como autofagolisosoma o autofagolisoma, en la cual se degrada la carga mediante hidrolasas lisosomales. Tomada y modificada de “Autophagy in *C. elegans*” (p.3), por Meléndez, A. y Levine B., 2009, *WormBook*.

El complejo CSW actúa en cada paso de la autofagia de la siguiente manera:

a) Translocación e iniciación.

El complejo CSW se une a la proteína Rab1 (ya activa) y media su interacción con el complejo ULK1 para translocarlo al fagóforo (Webster, C.P. et al., 2016). De igual forma se sabe que la proteína TBK1 (quinasa 1 de unión a TANK) fosforila a SMCR8 en el complejo CSW para que actúe como GEF para Rab39, contribuyendo a la activación y translocación del complejo ULK1 (Nassif, M. et al., 2017) (Figura 9A)

b) Elongación y reclutamiento de la carga.

El complejo CSW interactúa con las proteínas Rab8a y Rab39b, estas se unen a las proteínas p62/SQSTM1 y optineurina (OPTN). La proteína Rab8a recluta a TBK1 para que fosforile a OPTN y potenciar su interacción con LC3-II (proteína de cadena ligera 1A/1B asociada a microtúbulos) con el fin de facilitar el reclutamiento de la carga y la progresión de la autofagia (Figura 9B).

- c) **Compleción/ maduración y cierre.**
 El complejo CSW activa a Rab5 para promover la maduración y cierre del autofagosoma (Webster, C.P. et al., 2016; Pang, W. y Hu, F., 2020; Zhou, F. et al., 2017). El complejo CSW al activar a Rab11 puede mediar la formación de anisomas (Pang, W. y Hu, F., 2020; Nassif, M. et al., 2017; Ao, X. et al., 2014) (Figura 9C).
- d) **Fusión con el lisosoma y degradación.**
 La proteína Rab7, mediante el complejo CSW, es la encargada de la fusión entre el autofagosoma o anisoma con el lisosoma para formar el autolisosoma (Kuchitsu, Y. y Fukuda, M. et al, 2018). Otras Rab que también se han descrito como involucradas en este paso final son Rab8b y Rab9 (Webster, C.P. et al., 2016, Nassif, M. et al., 2017; Pang, W. y Hu, F., 2020) (Figura 9D).

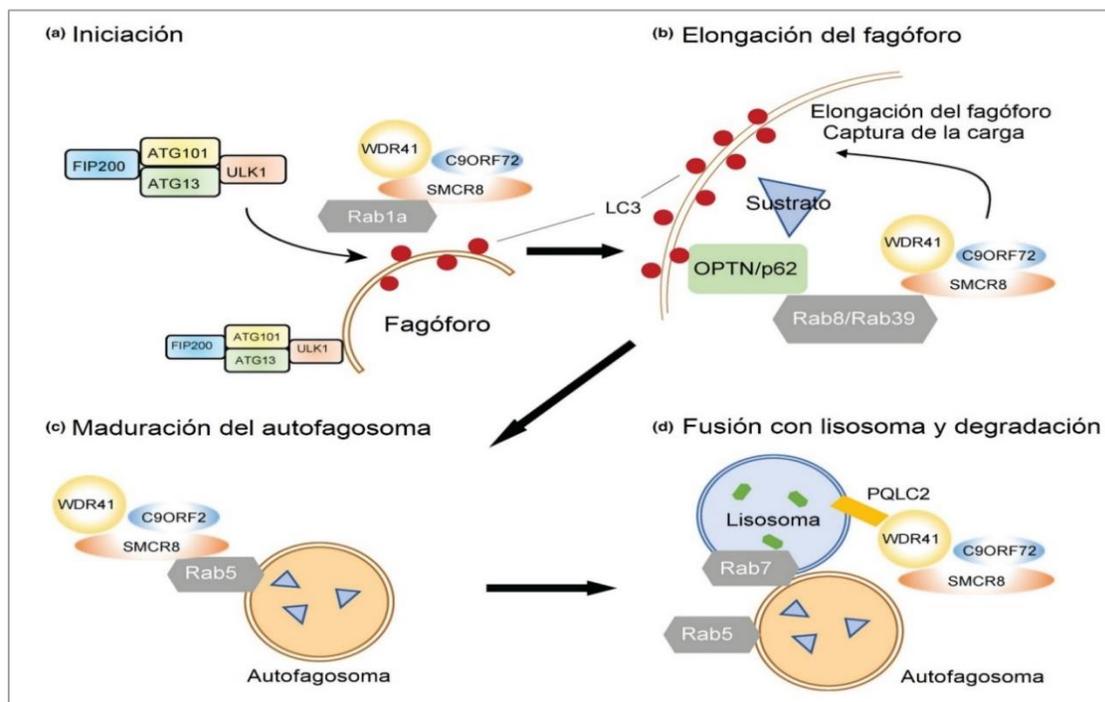


Figura 9. Complejo CSW regula la iniciación y progresión en la macroautofagia. Nota: El complejo CSW: A) actúa río abajo de Rab1 para reclutar al complejo ULK1 al fagóforo. B) interactúa con Rab8 y Rab39 para la entrega del sustrato (carga) a los autofagosomas, C, D) interactúa con Rab5 y Rab7 para la maduración del autofagosoma y fusión del autofagosoma-lisosoma, respectivamente. Tomada y modificada de "Cellular and physiological functions of C9ORF72 and implications for ALS/FTD", por Pang, W. y Hu, F., 2020, *Journal of Neurochemistry*, 157(3).

3.3.4.1.3 Otras vías de tráfico membranar.

Las C9orf72 y SMCR8 tienen una función en la exocitosis lisosomal pues la deficiencia de ambas proteínas causa un incremento en la exocitosis lisosomal en macrófagos (Braems, E. et al., 2020; Pang, W. y Hu, F., 2020). La C9orf72 actúa como GEF para la proteína Rab7L1, la cual se localiza en el aparato de Golgi y se ha demostrado participa en la secreción de vesículas extracelulares y en el tráfico de la red trans-Golgi (TGN) (Aoki, Y. et al., 2017; Braems, E. et al., 2020). Debido a que la C9orf72 se localiza en el poro nuclear e interactúa con sus componentes, podría tener un rol en el transporte nucleocitoplásmico. (Braems, E. et al., 2020; Freibaum, B.D. et al., 2015).

3.3.4.2 Función en el sistema inmune.

La proteína C9orf72 es altamente expresada en células mieloides, especialmente en las microglías, lo que da una pauta de que está implicada en la modulación de la inflamación (Pang, W. y Hu, F., 2020; Trageser, K.J. et al., 2019).

La autofagia y el tráfico endolisosómico están relacionados con la inflamación dado que su función es eliminar los componentes innecesarios o peligrosos para la célula, y las proteínas mTORC1 y C9orf72 cumplen un rol importante en cada uno de ellos (Figura 10A).

Se han propuesto diversos mecanismos en los cuales la proteína C9orf72 o el complejo CSW modulan la inflamación (Figura 10B):

- a) El complejo CSW modula la actividad de los receptores tipo Toll (TLRs) endosomales (Pang, W. y Hu, F., 2020). El TLR9 detecta oligodeoxinucleótidos que contienen DNA/CpG bacteriano (CpG ODN) dentro del compartimiento endosomal. Al activarse, hay una cascada de señalización para la transcripción de genes asociados a citocinas. La proteína Arf6 en su forma activa incrementa la captación de CpG ODN con el fin de aumentar la señalización de TLR9. El complejo CSW actúa como GAP para Arf6, reduciendo la vía de señalización de TLR9 y por consiguiente disminuyendo la producción de citocinas (Zhou, W., et al., 2013; Echeverri, N.P. y Mockus, I., 2008; Pang, W. y Hu, F., 2020).

- b) La proteína C9orf72 suprime la producción del interferón de tipo I (IFN-I) en la vía cGAS-STING. La transcripción génica del IFN-I (α y β) es regulada por STING (proteína estimuladora de genes de interferón). C9orf72 facilita la degradación lisosomal de STING, impidiendo así la transcripción de la citocina (Pang, W. y Hu, F., 2020; Martín-Sánchez, O., et al., 2019; Barber, G.N., 2015; Zhang, C. et al. 2019).
- c) C9orf72 es clave para la función lisosomal. Cuando no hay una degradación de sustratos, citocinas o receptores involucrados en la respuesta inmune se puede presentar un aumento en la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, si los TLRs u otros receptores no se degradan, se prolonga su señalización que conduce a inflamación. (Pang, W. y Hu, F., 2020).
- d) C9orf72 regula la inflamación mediante mTORC1. Aunque no se sabe con exactitud su interacción, hay estudios en los que se inhibió a mTORC1 en ratones con bajos niveles de C9orf72 y SMCR8 rescatándolos de esplenomegalia y otras respuestas inflamatorias. Esto indica que mientras mTORC1 promueve la respuesta inflamatoria, el complejo CSW la disminuye. (Pang, W. y Hu, F., 2020; Bodur, C. et al., 2017).

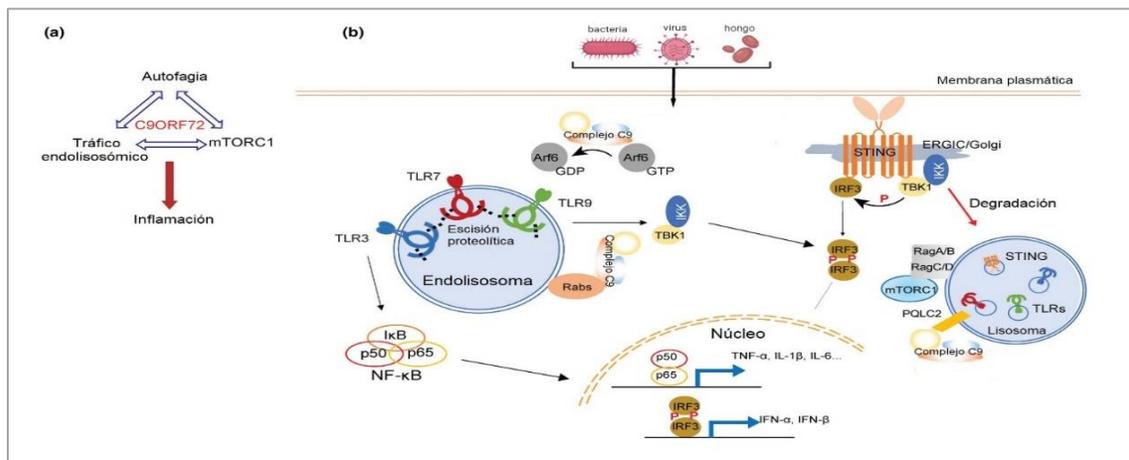


Figura 10. La función del complejo CSW en la respuesta inmune innata. Nota: a) C9orf72 regula la respuesta inflamatoria al intervenir en tráfico endolisosomal, autofagia y señalización de mTORC1. b) Posibles mecanismos del complejo CSW en la señalización de respuesta inmunológica innata: modulación de TLRs (es GAP para Arf6); degradación lisosomal de moléculas, STING y receptores; afectación de la vía de señalización de mTORC1. Tomada y modificada de “Cellular and physiological functions of C9ORF72 and implications for ALS/FTD”, por Pang, W. y Hu, F., 2020, *Journal of Neurochemistry*, 157(3).

3.3.4.3 Otras funciones.

En ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina (inestabilidad dinámica) es esencial para el crecimiento axonal y plasticidad sináptica. La cofilina es una proteína importante para la organización de los filamentos de actina y si está fosforilada, se inactiva (Nassif, M. et al., 2017; Sidavasan, R. et al., 2016). Las pequeñas GTPasas, también regulan al citoesqueleto. Cuando las proteínas Arf6, Arf1 y Rac1 se encuentran activas, se promueve la activación de las cinasas LIMK1/2 las cuales son capaces de fosforilar e inactivar a la cofilina. La proteína C9orf72 es capaz de inactivar a las pequeñas GTPasas evitando que se fosforile la cofilina y de esta manera se permite el ensamblaje de actina para promover crecimiento axonal en neuronas motoras (Iyer, S. et al., 2018; Pang, W. y Hu, F., 2020).

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el cerebro y está implicado en la regulación de sistemas motores, sensitivos y cognitivos. Si los niveles de glutamato son anormalmente altos puede provocar muerte neuronal por neurotoxicidad (Giménez, C. et al., 2018). Si hay una expresión baja de la proteína C9orf72, hay una regulación a la baja de genes asociados al ciclo glutamina-glutamato (CGG) y acumulación intracelular de glutamato. Asimismo, reprime la expresión de la proteína GLUL, responsable de la conversión de glutamato a glutamina, sin ella hay acumulación de glutamato y disminución de niveles de GABA. C9orf72 también regula a algunos receptores de glutamato a través de Rab GTPasas. La proteína Rab8a está involucrada en la regulación del tráfico neuronal y en transporte dendrítico de los receptores ionotrópico (AMPA) y metabotrópico del glutamato. Rab39b igualmente regula el tráfico de la subunidad GluA2 del receptor AMPA a través de su efector PICK1 (proteína que interactúa con C cinasa 1). Es posible que el complejo CSW sea GEF para ambas Rab GTPasas (Tang, B.L., 2016).

Los gránulos de estrés (SG) son agregados transitorios de ribonucleoproteína, cuyo ensamblaje es una estrategia celular para promover la supervivencia y reducir el daño relacionado ante condiciones de estrés celular (Markmiller, S. et al., 2018;

Mahboubi, H. y Stochaj, U., 2017). En estas condiciones, C9orf72 (C9-L) es reclutado para la formación de SG. También está involucrado en la recuperación celular del estrés y, junto con p62, C9orf72 es importante para la eliminación de SG mediante autofagia (Braems, E. et al., 2020; Pang, W. y Hu, F., 2020).

La enzima ACC (acetil-CoA carboxilasa) regula la síntesis *de novo* de ácidos grasos, su transcripción está regulada por la proteína CARM1 (coactivador asociado a la arginina metiltransferasa 1). C9orf72 regula negativamente a CARM1 y se ha reportado que los niveles de lípidos están aumentados en células deficientes de C9orf72 en condiciones de inanición (Pang, W. y Hu, F., 2020).

3.4 Hexanucleótidos repetidos expandidos

3.4.1 Hexanucleótidos repetidos y localización

Dentro del gen *C9ORF72* existe un repetido de hexanucleótidos GGGGCC (G_4C_2) que se encuentra entre los exones 1a y 1b. Para las variantes transcripcionales 1 y 3 se localiza en el primer intrón y para la variante 2 se localiza dentro de la región promotora (Figura 4) (Balendra, R. e Isaacs, A.M., 2018; Souza, P.V.S et al., 2015).

3.4.2 Número de hexanucleótidos repetidos silvestres y expandidos

Los individuos sanos presentan entre 2 y 23 repeticiones de G_4C_2 sin embargo, en los estudios poblacionales se utiliza un límite de hasta 30 repeticiones para individuos sanos (Pang, W. y Hu, F., 2020; Balendra, R. e Isaacs, A.M., 2018).

En 2011 dos estudios independientes identificaron que la expansión del hexanucleótido G_4C_2 en el gen *C9ORF72* causaba ELA, DFT o ELA/DFT (Rizzu, P. et al., 2016; DeJesús-Hernández, M. et al., 2011; Renton, A.E. et al., 2011).

Algunos de los pacientes con ELA y/o DFT presentan hexanucleótidos repetidos expandidos (HRE) desde 30 hasta miles de repetidos. Como se ha mencionado, se debe tener cuidado con el límite de 30 repeticiones, dado que puede haber

individuos sanos y pacientes con este número (Lai, J.D. e Ichida, J.K., 2019; Van Blitterswijk, M. et al, 2012).

Se ha planteado que repetidos intermedios (10-30 repetidos G₄C₂) son asociados como factores de riesgo en desórdenes autoinmunes como esclerosis múltiple primaria progresiva, lupus eritematoso y artritis reumatoide (Lai, J.D. e Ichida J.K., 2019).

Recientemente, dado el papel de *C9ORF72* en autofagia e inmunomodulación, se ha propuesto que repetidos intermedios pueden influir en el proceso patogénico que conduce a fenotipos de COVID-19 más graves (Zanella, I. et al., 2021).

3.4.3 Consecuencias de hexanucleótidos repetidos expandidos a nivel molecular

Molecularmente, se han propuesto 3 mecanismos por los cuales el hexanucleótido repetido se expande (HRE) e induce cambios neurodegenerativos (Babić Leko, M. et al., 2019):

a) Pérdida de función de *C9orf72* por haploinsuficiencia

Se ha reportado que portadores (ELA y/o DFT) del HRE tienen niveles reducidos de mRNA que se ven reflejados en bajos niveles de proteína debido a la pérdida de la transcripción del alelo mutante (Babić Leko, M. et al., 2019). Se ha propuesto que esta regulación a la baja se debe a modificaciones epigenéticas, específicamente la hipermetilación de la isla CpG en la región promotora de *C9ORF72*, la metilación de la expansión en sí o inclusive la trimetilación de histonas en residuos de lisina (Yang, Q. et al., 2020; Nassif, M. et al., 2017). Este silenciamiento del gen podría ser un mecanismo protector (Todd, T.W. y Petrucelli, L., 2016). Otra posibilidad es que el HRE causa inestabilidad transcripcional: afecta directamente la procesividad de las ARN polimerasas, haciendo que se detengan, se deslicen o se liberen durante el inicio o elongación de la transcripción (Haeusler, A.R. et al., 2016). Asimismo, la región que contiene al HRE podría

formar estructuras de DNA de orden superior que puede dar lugar a una transcripción abortiva (Babić Leko, M. et al., 2019).

b) Ganancia de función tóxica por RNA aberrante

Debido a la secuencia del HRE se pueden formar estructuras de orden superior de RNA y DNA (Figura 11).

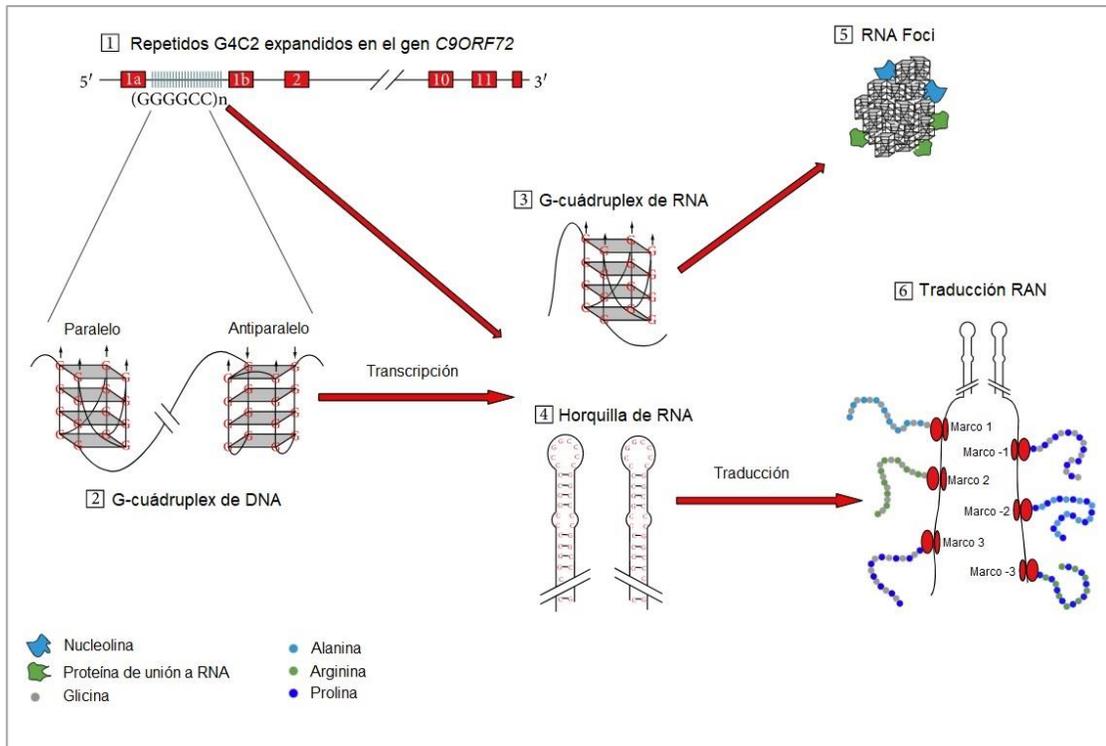


Figura 11. Estructuras formadas por la transcripción y traducción del HRE. Se muestran las estructuras de DNA (2), RNA (3-5) y proteínas (6) que se forman por la presencia del hexanucleótido repetido expandido G₄C₂. Tomada y modificada de “Molecular Mechanisms of Neurodegeneration Related to C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion”, por Babić Leko, M. et al., 2019, *Behavioral Neurology*.

Las estructuras principales son:

- G-cuádruplex: Las hebras de DNA o RNA que están compuestas por tramos de guaninas divididos por otras bases pueden formar esta estructura helicoidal con planos apilados de tétradas de guanina, conectados por enlaces de hidrógeno de Hoogsten y estabilizados por cationes como Na⁺ o K⁺. Según la orientación de las hebras, puede adoptar conformaciones paralelas o antiparalelas (Figura 11) (Liu, C. et al., 2019). Debido a la uniformidad de la secuencia G₄C₂, la región

del DNA con el HRE puede formar G-cuádruplex, provocando la generación de RNA abortado. De igual manera los transcritos con HRE pueden formar G-cuádruplex de RNA (Babić Leko, M. et al., 2019).

- Horquilla de RNA: Molécula de RNA cuya conformación contiene una región de tallo con emparejamiento de bases complementarias y una región bucle estrecho al final del tallo (Haeusler, A.R. et al., 2016).
- Bucles-R (*R-loops*): Estructura híbrida en la que el RNA con HRE puede formar híbridos con el DNA con HRE, afectando la replicación, transcripción y traducción de la región circundante (Babić Leko, M. et al., 2019).

Los transcritos de RNA sentido y antisentido con HRE (G-cuádruplex y horquillas) se pueden acumular y formar agregados nucleares conocidos como focos de RNA. Estos se han localizado de manera predominantemente nuclear en cerebro, neuronas motoras y glía de pacientes ELA/DFT con el expandido. Los focos de RNA pueden secuestrar a RBP como ADARB2, ALYREF, hnRNP H, hnRNP A1, nucleolina, Pur α y SRSF2, RanGAP1, entre otras (Babić Leko, M. et al., 2019; Haeusler, A.R. et al., 2016; Smeyers, J. et al., 2021). Esto conlleva a un procesamiento disfuncional del RNA, estrés nucleolar, acumulación de mRNA en el núcleo y defectos en su transporte, además pérdida de la función de las RBP (Babić Leko, M. et al., 2019; Todd, T.W. y Petrucelli, L., 2016).

c) Ganancia de función tóxica por acumulación de proteínas DPR

Las mutaciones de repetidos expandidos sufren una traducción no-ATG asociada a la repetición (RAN), la cual se lleva a cabo sin el codón de iniciación canónico AUG y en múltiples marcos de lectura; además, la traducción ocurre en las hebras sentido y antisentido (Cleary, J.D. et al., 2018). Los transcritos de RNA del HRE pueden sufrir una traducción RAN dando como resultado cinco proteínas de dipéptidos repetidos (DPR). Las

proteínas poli-glicina-alanina (poli-GA), poli-glicina-prolina (poli-GP) y poli-glicina-arginina (poli-GR) se sintetizan a partir de la hebra sentido y las proteínas poli-glicina-prolina (poli-GP), poli-prolina-arginina (poli-PR) y poli-prolina-alanina (poli-PA) a partir de la hebra antisentido. Las DPR se encuentran agregadas en forma de inclusiones en diversas regiones del cerebro de pacientes que portan la expansión (Todd, T.W. y Petrucelli, L., 2016). Las DPR que contienen arginina son altamente tóxicas (poli-PR y poli-GR) pues interfieren en el transporte nucleoplasmático, procesamiento de RNA y en gránulos de estrés, además causa estrés nucleolar. La proteína poli-GA altera el sistema de proteasoma de ubiquitina y causa estrés en el RE (Babić Leko, M. et al., 2019; Todd, T.W. y Petrucelli, L., 2016).

Se ha propuesto que la expansión en *C9ORF72* causa ELA y/o DFT como resultados de la reducción en la función fisiológica de la proteína C9orf72, complementada por una ganancia de función tóxica del RNA y de las DPRs (Nassif, M. et al., 2017).

3.4.4 HRE como causante de ELA y ELA/DFT

Se ha reportado que el HRE del gen *C9ORF72*, es el causante del 40% de ELA^f, 5-7% de ELAs, 25% de DFT^f, 5-7% DFTs y 88% de ELA/DFT (Yang, Q. et al., 2020; Riboldi, G. et al., 2014; Cruts, M. et al., 2013; Ticozzi, N., 2017; Byrne, S. et al., 2012). Además, los pacientes con ELA/DFT o con AHF, ya sea de demencia o con MND, tienen un mayor riesgo de portar el expandido (33-86%), confirmando que ambas enfermedades pertenecen al mismo espectro o convergen en la misma ruta patogénica (Ticozzi, N., 2017).

Uno de los mecanismos más descritos por los cuales el HRE causa ELA y/o DFT es la alteración del transporte nucleoplasmático. Se ha propuesto que dicho proceso puede ser el resultado de la pérdida de función de la isoforma C9-S, así como la ganancia de función de los productos generados a partir del expandido de *C9ORF72*. Los focos de RNA interactúan con factores de exportación del RNA en el núcleo y componentes unidos al núcleo o al complejo del poro nuclear; además, las DPR ricas en arginina pueden secuestrar proteínas de transporte

nucleoplasmático como RanGAP1 (Heusler, A.R. et al, 2016; Yang, Q. et al., 2020). Una consecuencia de este proceso es la localización de agregados citoplásmicos de TDP-43, que a su vez exacerba los defectos de dicho transporte, y forma un circuito de retroalimentación positiva que aumenta los niveles de proteínas DPR (Yang, Q. et al., 2020) (Figura 12). Otro ejemplo es el secuestro de nucleolina, una proteína esencial, desencadenando el estrés nucleolar (Yang, Q. et al., 2020).

Por ganancia de función del HRE se puede perturbar el metabolismo del RNA: los focos de RNA, estructuras G-cuádruplex y las proteínas DPR pueden secuestrar a RBP e interrumpen los procesos de *splicing*, transporte y traducción de RNAm (Babić Leko, M. et al., 2019; Pang, W. y Hu, F., 2020; Yang, Q. et al., 2020).

La haploinsuficiencia de C9orf72 también tiene como consecuencia alteración de la autofagia y neuroinflamación. Defectos en la autofagia alteran la homeostasis de proteínas, dado que se evita la degradación de proteínas dañadas, mal plegadas y no deseadas (Babić Leko, M. et al., 2019); esta ruta también evita la eliminación de proteínas DPR y agregados citoplasmáticos de TDP-43 (Yang, Q. et al., 2020; Beckers, J. et al., 2021). La expresión de C9orf72 se ve disminuida en la microglía y aumenta la inflamación del SNC coincidiendo con un aumento de la toxicidad en las neuronas que conduce a la neurodegeneración (Pang, W. y Hu, F., 2020; Yang, Q. et al., 2020). Al mismo tiempo la autofagia alterada contribuye a la inflamación, pues impide la eliminación de moléculas proinflamatorias, peligrosas o no deseadas que también pueden llegar a causar autoinmunidad (Pang, W. y Hu, F., 2020; Lai, J.D. e Ichida, J.K., 2019).

Bajos niveles de la proteína C9orf72 también pueden regular a la baja genes asociados al GGC, causando acumulación de glutamato intracelular y neurodegeneración por excitotoxicidad (Fomin, V. et al., 2018; Lai, J.D. e Ichida, J.K., 2019). Por otro lado, la proteína DPR poli-GR podría comprometer la función mitocondrial y generar estrés oxidativo, mientras que la poli-PR influye negativamente en la estructura de la heterocromatina (Hardiman, O. et al., 2017; Yang, Q. et al., 2020). Inclusive, se ha visto un aumento de apoptosis neuronal por

una desregulación en los canales de calcio de retículo endoplásmico (Babić Leko, M. et al., 2019).

Adicionalmente el HRE de *C9ORF72* podría desencadenar alteraciones en otros procesos como endocitosis (Kiral, F.R. et al., 2018), transporte axonal en neuronas motoras (Pang, W. y Hu, F., 2020), transporte entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Ghasemi, M. et al., 2021), ensamblaje de gránulos de estrés (Hardiman, O. et al., 2017), afección en crecimiento de axones de neuronas motoras (Pang, W. y Hu, F., 2020), entre otros (Figura 12).

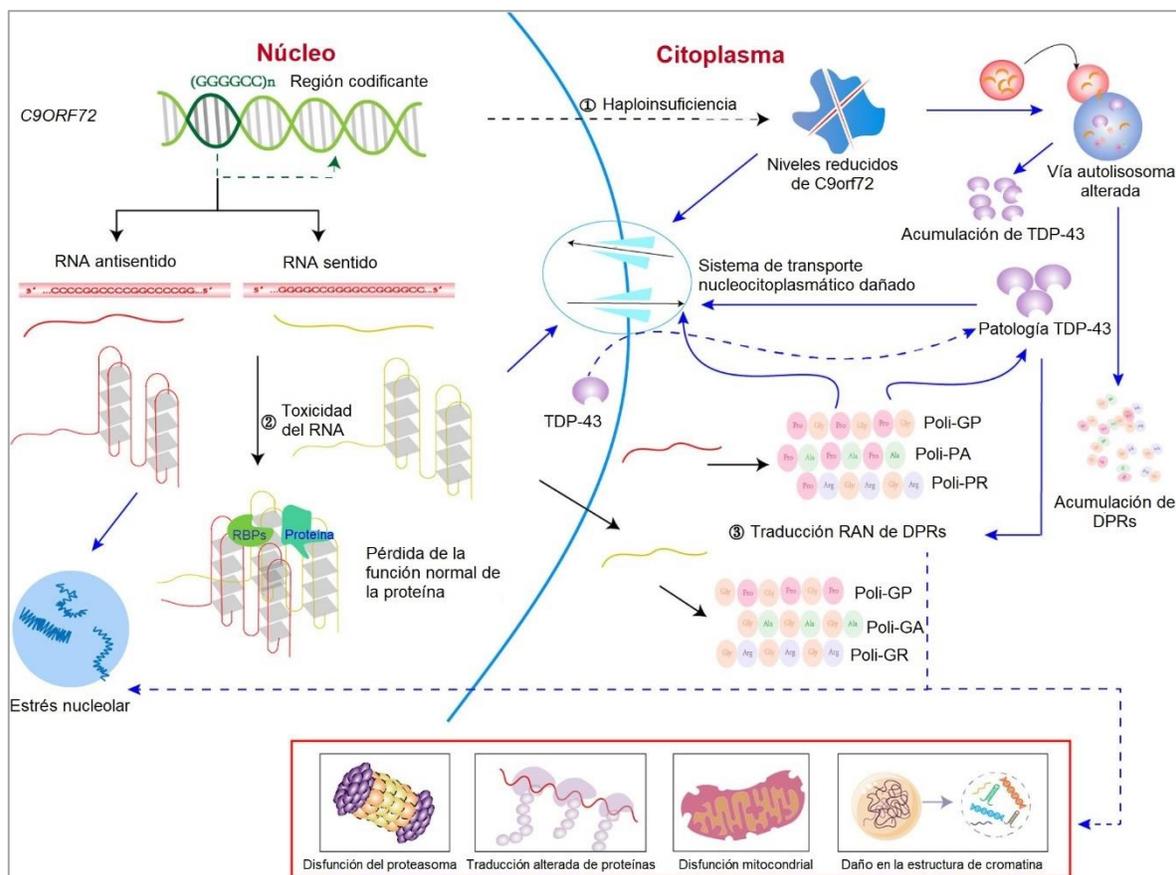


Figura 12. Vías patológicas del HRE de *C9ORF72*. Se muestran las consecuencias de la pérdida y ganancia de función de *C9orf72*. Tomada y modificada de “The Development of *C9orf72*-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Disorders”, por Yang, Q. et al, 2020, *Frontiers in Genetics*, 11.

3.4.5 Tratamientos dirigidos hacia el HRE

En la actualidad se están desarrollando tratamientos para los pacientes con ELA y/o DFT que tienen el HRE. Las moléculas artificiales de RNA pequeños de interferencia

(siRNA) y microRNA (miRNA) se han propuesto para combatir la ganancia de función tóxica generada por el HRE (Mayl, K. et al., 2021; Martier, R. et al., 2019a). De hecho, estudios *in vitro* de miRNA administrado en un vector de virus adeno-asociado (AAV) a células neuronales resultaron en reducción de RNAm y de focos de RNA nuclear (Martier, R. et al., 2019a).

Otro enfoque que se ha propuesto es el uso de oligonucleótidos antisentido (AOs) que se unen al RNAm que contiene al expandido y lo degrada a través de la RNAsaH (Mayl, K. et al., 2021), de esta manera se previene la producción de DPRs y de focos de RNA (Beckers, J. et al., 2021). Experimentos *in vivo* de AOs utilizados en ratones con la patología de *C9ORF72* demostraron que no se afectaron los niveles de proteína *C9orf72* normal (Babić Leko, M. et al., 2019).

Además, ha sido propuesto el uso de anticuerpos anti-DPR como una estrategia terapéutica para el HRE (Mayl, K. et al., 2021). Se ha probado que los anticuerpos anti-GA fueron efectivos para reducir los agregados de poli-GA en un modelo de roedor (Zhou, Q. et al., 2019; Beckers, J. et al., 2021).

Igualmente se ha planteado la posibilidad de usar moléculas pequeñas dirigidas a la estructura secundaria del RNA o G-cuádruplex originado por el expandido (Mayl, K. et al., 2021) o a diversos procesos involucrados en la patología como el transporte nucleocitoplásmico defectuoso o traducción RAN. Respecto es este último, se sabe que la proteína K dependiente de RNA (PKR) regula la traducción RAN y se ha demostrado que la metformina inhibe su fosforilación implicando una reducción de DPR *in vivo* e *in vitro* (Xu, X. et al., 2021; Mayl, K. et al., 2021).

Los estudios para el tratamiento de ELA/DFT asociado al HRE de *C9ORF72* van aumentando y avanzando desde su descubrimiento en el 2011, por lo que es importante determinar si los pacientes se asocian con la patología del expandido lo que abre la posibilidad de ser candidatos para las terapias que se están desarrollando.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa fatal cuya expectativa de vida es de 5 años en promedio. Se caracteriza por el daño en las neuronas motoras que causan una pérdida del movimiento de manera progresiva (Wen, X. et al., 2017). En esta enfermedad se han asociado diversas variantes génicas de diversos genes como *SOD1*, *FUS*, *TARDBP*, *CHCHD10*, *C9ORF72*, etc.

Molecularmente, se ha descrito que una de las principales causas genéticas de la ELA es la expansión de hexanucleótidos GGGGCC repetidos (mayor a 30 repetidos) en el gen *C9ORF72* (Kumar, V. et al., 2017).

En México aún no hay algún estudio acerca del número de repetidos de este gen, por lo tanto ¿Cuál será el número de repetidos en población mexicana sana control y en pacientes mexicanos con ELA?

La determinación del número de hexanucleótidos en población mexicana es importante debido a que sería un método de diagnóstico molecular para el paciente con ELA, ELA/DFT, DFT, permitirá conocer cuál es el rango normal de esta expansión en nuestra población y establecer los rangos patológicos y cómo se distribuyen en nuestra población. En la familia es importante establecer los riesgos para la descendencia y abrir oportunidades terapéuticas para los pacientes.

V. JUSTIFICACIÓN

La determinación del número de hexanucleótidos repetidos como principal causa de ELA no se ha realizado en México, su estudio permitirá determinar cuál es el número de repetidos en una muestra control sana de población mexicana y en pacientes con ELA. Lo anterior con el fin de establecer el rango de alelos no afectados y mutados en los grupos de estudio.

Aunque esta expansión de repetidos está identificada como una de las principales causas de la enfermedad, estudios realizados en Estados Unidos reportan que en pacientes hispanos solo un 8.3% presentan expandidos (Majounie, E. et al., 2012).

Sin embargo, dado los procesos de mestizaje en México, ese porcentaje podría variar.

Por otra parte, la determinación de repetidos contribuirá en el diagnóstico de pacientes mexicanos con ELA, ya que se encontraría la causa a nivel molecular. Actualmente se están desarrollando diversos tratamientos médicos para la enfermedad. Uno de ellos es el silenciamiento de los transcritos del gen mediante estrategias RNAi como siRNAs o bien oligonucleótidos antisentido (AO) mediados por RNAsa-H (Martier, R. et al., 2019b). Saber el número de repetidos en pacientes permitiría saber si son o no candidatos para este tipo de tratamientos ya que la confirmación de su diagnóstico en forma oportuna abre esa posibilidad, además de establecer los riesgos para la descendencia.

VI. HIPÓTESIS

El número de hexanucleótidos repetidos en el gen *C9ORF72* en controles sanos será menor a 30 repetidos, mientras que en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica será mayor a 30 repetidos.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Determinar el número de hexanucleótidos repetidos GGGGCC (G_4C_2) en el gen *C9ORF72* en pacientes mexicanos con Esclerosis Lateral Amiotrófica.

7.2 Objetivos particulares

- Establecer el número normal de repetidos en una muestra control sana de la población mexicana.
- Determinar el número de repetidos de hexanucleótidos en pacientes con ELA y establecer el rango de alelos no afectados y mutados.
- Establecer una correlación genotipo-fenotipo y su relación con el número de repetidos.

VIII. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio de tipo casos y controles, en el cual se realizó la determinación del número de hexanucleótidos repetidos en un grupo de 30 individuos sanos y en un grupo de 157 pacientes con diagnóstico de ELA, cuyas muestras de material genético se encontraban disponibles en el banco de DNA del Departamento de Genética y Biología Molecular del INNNMVS para el desarrollo del protocolo aprobado 129/14 “Caracterización del aspecto clínico y molecular de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)” cuyas consideraciones éticas se apegan a los principios de la Declaración de Helsinki ([2022, The World Medical Association](#)).

8.1 Población de estudio

A) Se incluyeron en el estudio 157 pacientes mexicanos mayores de 18 años con diagnóstico de ELA en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS) que aceptaron, mediante consentimiento informado (Apéndice A), entrar al proyecto de investigación “Caracterización del espectro clínico, bioquímico y molecular de la Esclerosis Lateral Amiotrófica” para encontrar variantes génicas de dicha enfermedad.

- **Criterios de inclusión.**

- ✓ Pacientes con diagnóstico clínico de ELA mediante criterios de El Escorial y la escala modificada.
- ✓ Pacientes mexicanos mayores de edad al momento de la toma de muestra sanguínea.
- ✓ Pacientes que acepten participar en el protocolo de investigación mediante la firma de un consentimiento informado.

- **Criterios de exclusión.**

- ✓ Pacientes que no cumplan el diagnóstico de El Escorial.
- ✓ Pacientes con ELA que se no deseen participar y/o no firmar el consentimiento informado para la participación en el estudio.

El grupo de pacientes fue conformado por 84 hombres (54%) y 73 mujeres (46%) con un radio H:M de 1.15:1 provenientes de 19 entidades federativas. (Figura 14). La edad de inicio promedio en los pacientes fue 48.8 ± 11.4 años (rango: 17 a 79 años) (Figura 13). Hubo un paciente cuya edad de inicio fue a los 17 años, sin embargo, ya era mayor de edad al momento de la toma de muestra sanguínea. El 8.8% de los pacientes fueron formas familiares y el 91.2% fueron casos esporádicos, y en 10 casos no fue especificado. De los pacientes analizados el 8.3% se asoció con antecedentes de demencia en la familia.

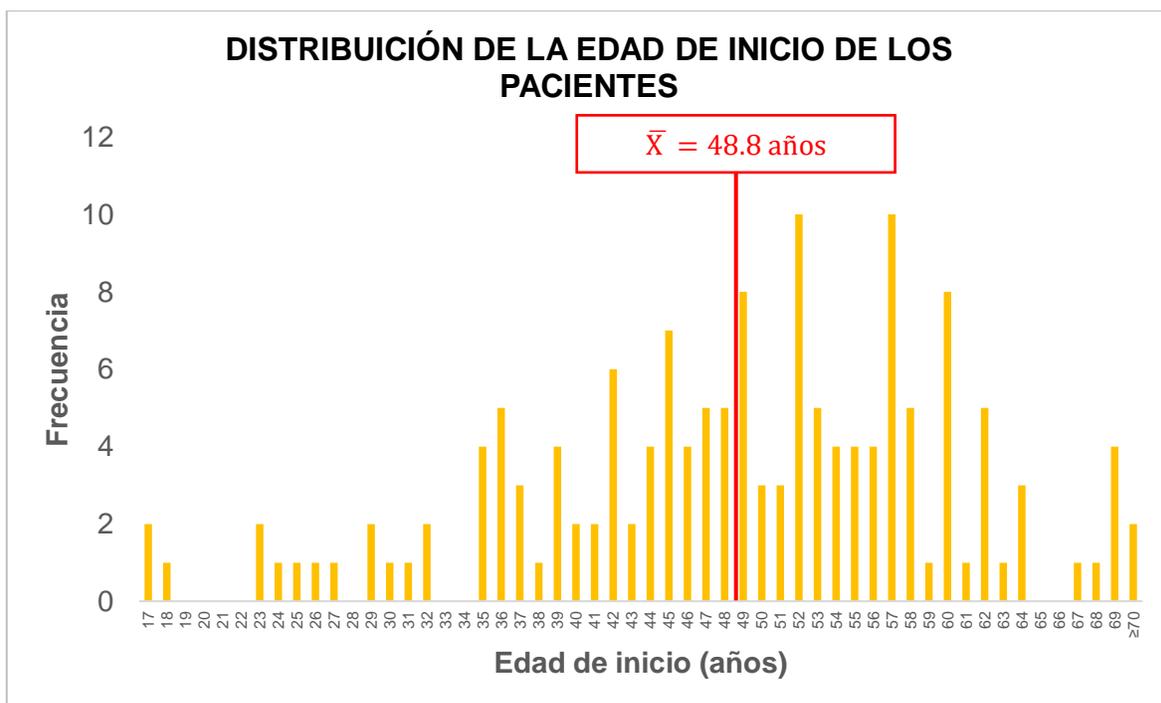


Figura 13. *Distribución de la edad de inicio de los pacientes evaluados.* Se muestra la distribución de la edad de inicio de los pacientes ELA evaluados, mediante un gráfico de barras con su respectiva media

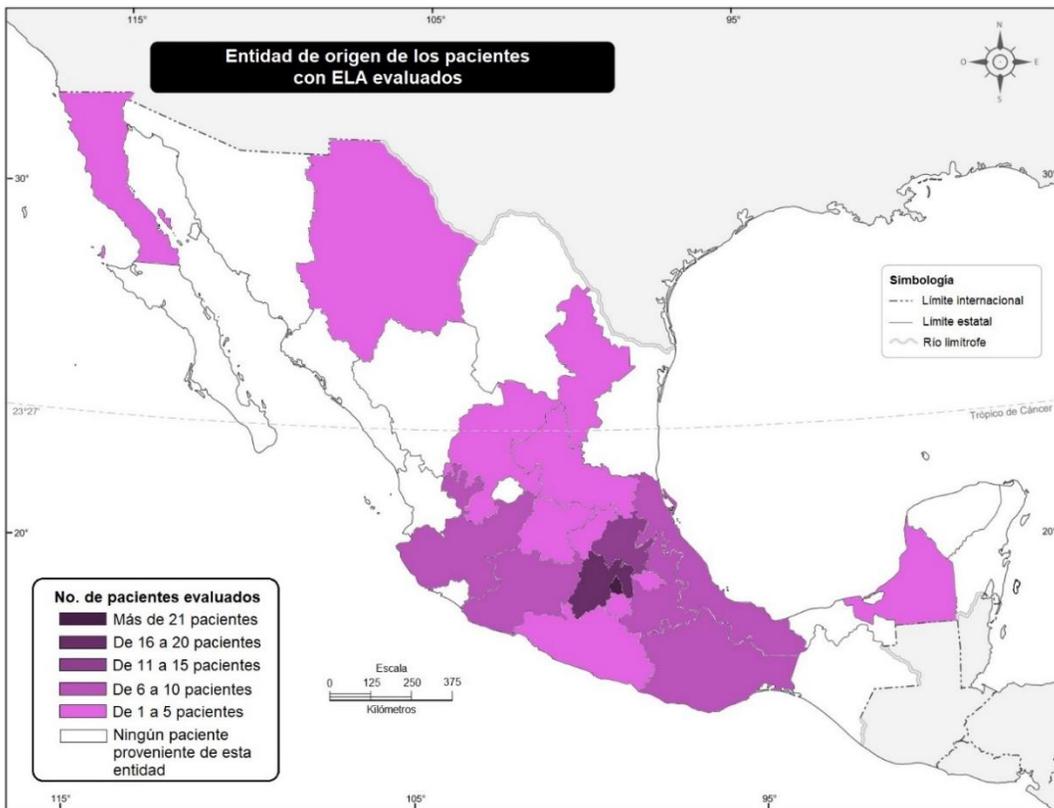
A**B**

Figura 14. Origen de los pacientes con ELA evaluados. Se muestra el número de pacientes de cada entidad federativa en una gráfica de barras (A) y en un mapa de dispersión (B). Mapa base tomado y modificado de “Cuéntame de México: mapas para imprimir”, por INEGI, 2020, Marco Geoestadístico Nacional.

B) Se incluyó un grupo control de 60 individuos sanos mexicanos mayores de 18 años, cuyo material genético se encontraba disponible en el banco de DNA del Departamento de Genética y Biología Molecular del INNNMVS, mediante un muestreo por conveniencia. Estuvo conformado por 30 hombres y 30 mujeres con un rango de edad de 18 a 80 años. Dicho grupo control se distribuyó de acuerdo con la Tabla 7.

Tabla 7. Distribución de grupo control sano.

Grupo	Rango de edad (años)	Número de mujeres	Número de hombres
1	18 – 38	10	10
2	39 – 59	10	10
3	60 – 80	10	10
Total de individuos por género		30	30
Total de individuos del grupo control		60	

- **Criterios de inclusión.**
 - ✓ Personas sanas mestizas mexicanas.
 - ✓ Personas mayores de edad.
- **Criterios de exclusión.**
 - ✓ Personas con antecedentes neurológicos.
 - ✓ Personas no mexicanas.
 - ✓ Personas menores de edad.

8.2 Materiales

En cada paso se utilizaron micropipetas (*Gilson*) de 1000, 200, 100, 50, 20 y 10 μ L.

A) Toma de muestra sanguínea: Tubo BD Vacutainer® con ACD, torunda con etanol al 70%, aguja BD Vacutainer® estéril, capuchón de Vacutainer®, torniquete, guantes desechables.

- B) Extracción y cuantificación de DNA: Muestra sanguínea, Buffer de Lisis de Glóbulos Rojos o BLGR pH 7.4 (en 2 L de agua estéril, disolver 16.58 g NH₄Cl, 2 g KHCO₃, 400 µL de EDTA 0.5 M a pH 8). También se utiliza: NaCl 5 mM, SDS 10%, NaCl 7M, CHCl₃/Alcohol isoamílico (49:1), etanol absoluto, etanol al 70% y agua estéril o libre de nucleasas. Tubos cónicos de 15 mL, pipetas de transferencia, microtubos *Eppendorf* 1.5 mL y de 0.6 mL. Equipos: centrífuga *Eppendorf 5810R* y concentrador al vacío *Eppendorf 5301 (speed-vac)*, agitador vórtex *Genie 2 Digital (Scientific Industries)*, Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- C) Electroforesis: Agarosa *GenePure LE (ISC BioExpress)*, bromuro de etidio, buffer de borato de sodio (SB) al 1%, colorante (azul de bromofenol 0.25% p/v, xilen-cianol 0.25% p/v y glicerol 30% v/v), buffer de carga (80 µL de colorante y 120 µL de agua inyectable), marcador de peso molecular (MPM) *GeneRuler 1kb DNA Ladder*. Equipos: balanza analítica AA-200 (*Denver Instrument Company*), microondas, cámara de electroforesis horizontal *ENDURO GEL XL (Labnet International, Inc.)*, transiluminador UV, fotodocumentador *BIO-RAD Gel Doc™ XR+* y software *Image Lab™*.
- D) PCR: Agua libre de nucleasas, *Buffer PCR 10x+MgCl₂ 20 mM (Roche)*, dNTP's 10 mM, Solución Q 5x, 7-deaza-dGTP 10 mM, DMSO, oligonucleótidos para *C9ORF72* descritos por DeJesus, M. et al (2011) (Tabla 8), *FastStart Taq DNA Polymerase*, (Roche). Microtubos *Eppendorf* 0.2 mL. *Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems*.

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos para la PCR de triple cebador.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
Sentido/ Forward	FAM-TGTAACGACGGCCAGTCAAGGA GGGAAACAACCGCAGCC
Ancla/ Anchor	CAGGAAACAGCTATGACC
Antisentido/ Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCGGGCCCGCCCGACCA CGCCCGGCCCCGGCCCCGG

E) Análisis de Fragmentos: Formamida HiDi, *GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard*. Placa para secuenciación de 96 pozos MicroAmp (*Applied Biosystems*). Equipo: Secuenciador 3130 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). *Software* para análisis de electroferogramas: *Microsatellite Analysis* (MSA) de *Thermo Fisher Cloud*.

8.3 Métodos

A continuación, se presenta de manera general la metodología que se siguió para la determinación de hexanucleótidos repetidos en el gen *C9ORF72*.

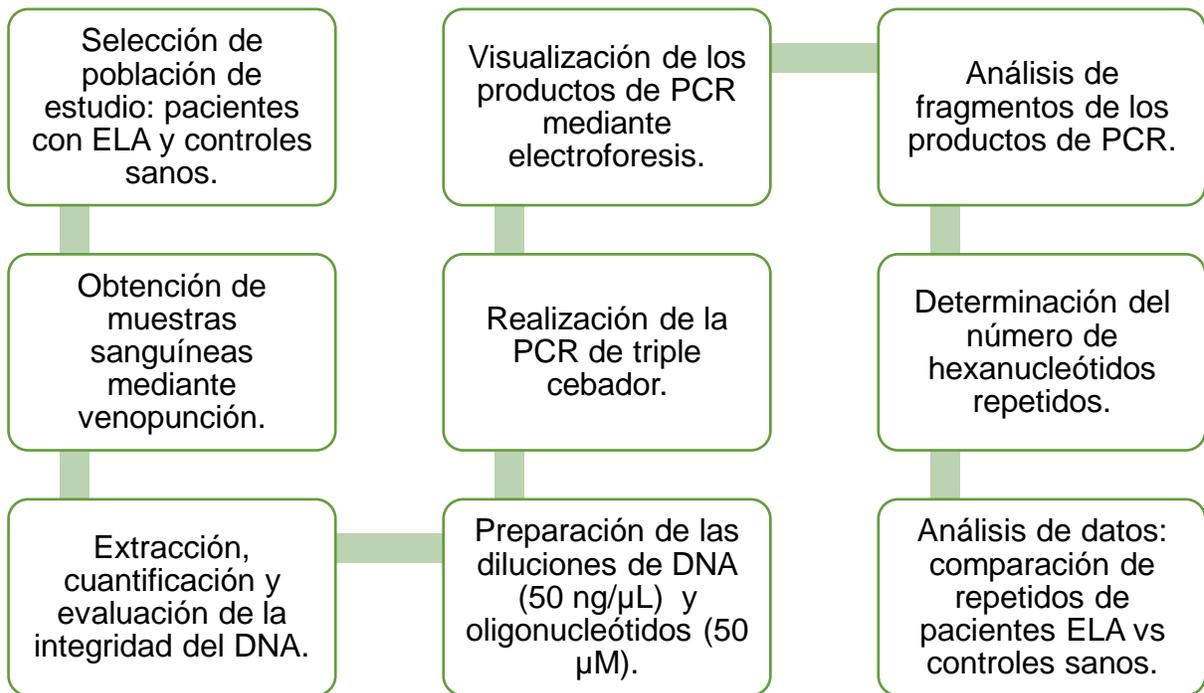


Figura 15. Metodología general empleada.

8.3.1 Toma de muestra sanguínea

Mediante el equipo Vacutainer[®], se recolectaron 3 tubos de 8.5 mL de sangre periférica del paciente o control por venopunción. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C para su preservación hasta el momento de su uso.

8.3.2 Extracción, cuantificación y evaluación de la integridad del DNA

- La muestra sanguínea se fraccionó en volúmenes de 3 mL. Cada volumen se colocó en un tubo cónico y por cada volumen de sangre se agregaron 3 volúmenes de buffer o amortiguador de lisis BLGR, por ejemplo, al verter 3 mL de la muestra sanguínea en un tubo cónico de 15 mL se agregaron 9 mL de BLGR. Posteriormente, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3000 rpm/ 6min/ 6°C. Se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de BLGR al botón y se resuspendió.
- La mezcla se transfirió a un microtubo *Eppendorf* de 1.5 mL, se centrifugó a 3000 rpm/ 3 min y se decantó el sobrenadante. El proceso de lavado se repitió 3 veces hasta que el botón de células mononucleares quedó libre de hemoglobina. Este paso fue esencial para lisar y descartar a los glóbulos rojos pues no poseen núcleo y por lo tanto carecen de DNA.
- Al botón de leucocitos se le agregó 570 μ L de NaCl 5mM y se agitó por 2 min. Se agregaron 40 μ L de SDS 10% y se volvió a agitar durante otros 2 min. Se adicionaron 200 μ L de NaCl 7M, se agitó por 10 min más y se centrifugó a 11500 rpm/ 20 min/ 6°C. El objetivo de este paso fue lisar a las células con el detergente aniónico SDS ya que desnaturalizó a las proteínas de la membrana celular, además el NaCl precipitó a las proteínas celulares en un proceso *salting-out*.
- Se centrifugó a 11500 rpm/ 20 min/ 6°C, se transfirió el sobrenadante a un microtubo *Eppendorf* de 1.5 mL y se agregaron 600 μ L de CHCl_3 /Alcohol isoamílico (49:1), se mezcló y se centrifugó a 14 000 rpm/ 20 min/ 6 min. En la fase clorofórmica quedaron inmersas las moléculas con baja polaridad como algunas proteínas y los lípidos, mientras que en la fase acuosa se hallaba el DNA.
- Se obtuvo la fase acuosa y se transfirió a un nuevo microtubo *Eppendorf* de 1.5 mL, se agregaron 600 μ L de etanol absoluto y se mezcló para precipitar al DNA. Se centrifugó a 14 000 rpm/ 20 min/ 6°C y se decantó el sobrenadante. Al botón de DNA se agregaron 600 μ L de etanol al 70% para eliminar sales remanentes, se centrifugó a 14 000 rpm/ 15 min/ 6°C y se decantó el sobrenadante.

- La muestra se secó en el equipo *speed-vac* a temperatura ambiente por 1 h. Se resuspendió con 100 μL de agua estéril y se dejó rehidratar durante toda la noche.
- Mediante el espectrofotómetro *NanoDrop*TM se cuantificó la cantidad de DNA de cada muestra, así como su pureza: la relación $260/280 > 1.8$ (contaminación respecto a proteínas) y $260/230 > 2.0$ (contaminación respecto a sales o carbohidratos). Tras la cuantificación se preparó una dilución de cada muestra de DNA a una concentración final de 50 ng/ μL . Para comprobar la integridad del DNA, se colocó 2 μL de cada muestra en un gel de agarosa al 1% y se realizó una electroforesis a 100 V durante 30 min. (Figura 16) El gel de agarosa también contuvo bromuro de etidio que es un tinte fluorescente e intercalante de DNA que permitió visualizar el material genético bajo luz UV.

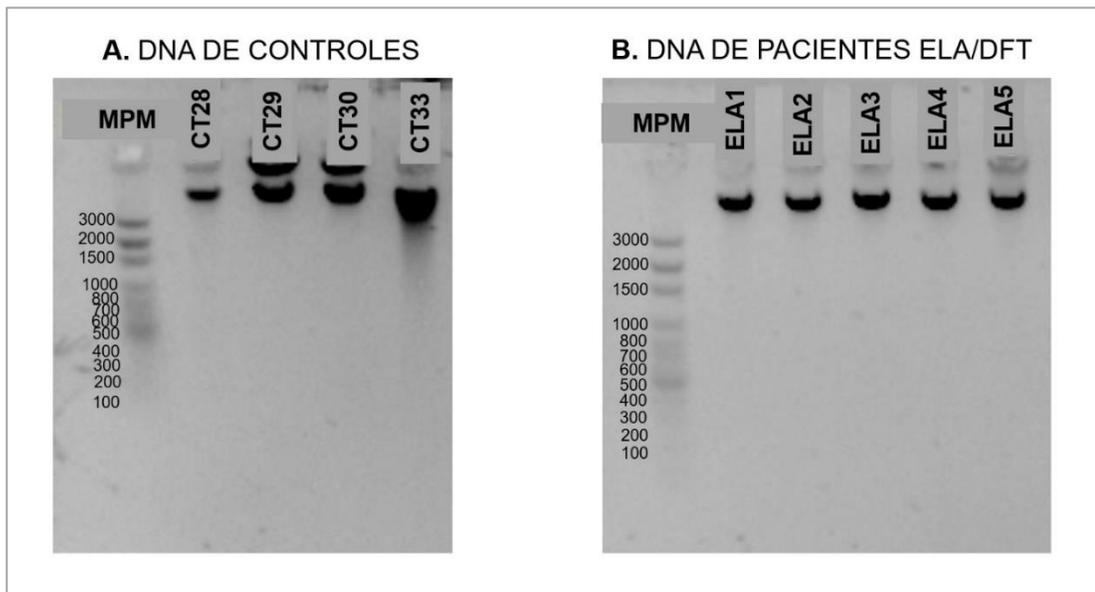


Figura 16. *Integridad de las muestras de DNA.* Se observó que el material genético de las muestras, tanto de controles sanos (A) como de pacientes (B), se presentaron como una banda sólida superior a los 3000 pb.

8.3.3 PCR de triple cebador

Se preparó en frío la mezcla de oligonucleótidos según la tabla 9.

Tabla 9. Mezcla de oligonucleótidos para la PCR de triple cebador.

Oligonucleótido	Vol. (μL)	Concentración final (μM)
Sentido (50 μM)	4	20
Antisentido (50 μM)	2	10
Ancla (50 μM)	4	20
Vol. final: 10 μL		

Se realizó en frío la mezcla de PCR en un microtubo *Eppendorf* de 0.2 mL de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 10. Mezcla de PCR de triple cebador para *C9ORF72*.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	12.4	---
Buffer PCR 10x + MgCl_2 20 mM	2.8	1x / 2mM
dNTP's 10 mM	0.56	0.2 mM
Solución Q 5x	5.6	1x
7-deaza-dGTP 10 mM	0.5	0.18 mM
DMSO	2	7%
Mezcla de oligonucleótidos	2	0.7 μM /1.4 μM
Polimerasa	0.14	0.7 U
DNA (50 ng/ μL)	2	100 ng
Vol. final: 28 μL		

Y los tubos con las mezclas se sometieron a las siguientes condiciones de PCR:

95°C/15 min		
94°C/1 min } 70°C/1 min } 72°C/ 3 min }	2 ciclos	94°C/1 min } 64°C/1 min } 72°C/ 3min }
		5 ciclos
94°C/1 min } 68°C/1 min } 72°C/ 3 min }	3 ciclos	94°C/1 min } 62°C/1 min } 72°C/ 3min }
		6 ciclos
94°C/1 min } 66°C/1 min } 72°C/ 3 min }	4 ciclos	94°C/1 min } 60°C/1 min } 72°C/ 3min }
		7 ciclos
		94°C/1 min } 58°C/1 min } 72°C/ 3 min }
		8 ciclos
		94°C/1 min } 56°C/1 min } 72°C/ 3 min }
		5 ciclos
		72°C/10 min 4°C/ ∞

Tras la PCR, los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2.5% a 100 V durante 60 min. Se utilizó el MPM *GeneRuler* 1kb DNA Ladder.

8.3.4 Análisis de fragmentos

Después de la reacción de PCR, se adicionó a cada producto de PCR, formamida HiDi y marcador 500 LIZ™ y se dispensaron en la placa de 96 pozos, la mezcla se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Reactivos y volúmenes para análisis de fragmentos.

Reactivo	Vol. (µL)
Formamida HiDi	10.7
Marcador 500 LIZ™	0.3
Producto de PCR	1
Vol. final	12

Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C por 5 min. e inmediatamente se colocaron en hielo. Posteriormente, la placa se analizó con el equipo secuenciador

3130 *Genetic Analyzer* y los resultados (electroferogramas) se analizaron con el software *Microsatellite Analysis (MSA)* de *Thermo Fisher Cloud*.

8.3.5 Determinación de hexanucleótidos repetidos

Para estimar el número de repetidos en cada muestra, se tomaron aquellos picos altos con más de 88 pb, y se realizó el cálculo de la siguiente manera:

- Se tomó como referencia la secuencia reportada en *Ensembl Genome Browser* (2021): “Transcript: C9orf72-206 ENST00000619707.5” (11 exones, 3338 pb, 481aa), que considera una secuencia total esperada para 3 repetidos, y se presenta a continuación:

5'-caaggagggaaacaaccgcagcctgtagcaagctctggaactcaggagtcgcgcgctagggggcc
ggggccggggccggggcggtggtcggggcgggcccgg-3'

- Una vez localizada se determinó la posición de unión los oligonucleótidos sentido (forward) y antisentido (reverse) para delimitar la región amplificada (Figura 17).

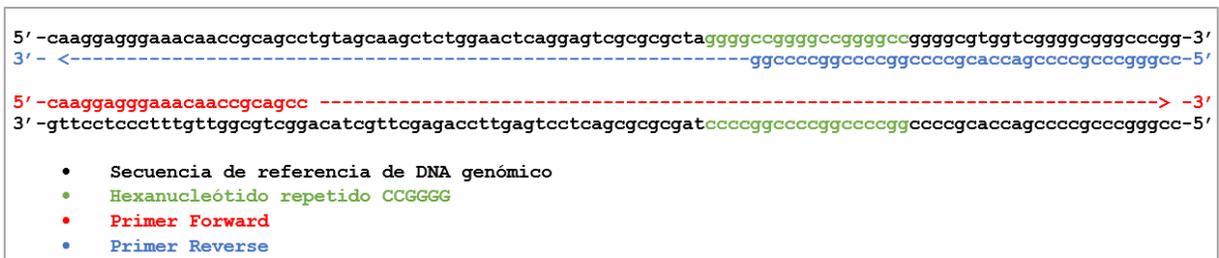


Figura 17. Sitio de unión de los oligonucleótidos en la región del HR. De acuerdo con los oligonucleótidos descritos en la publicación de DeJesus, M. et al (2011)

- Al delimitar la región se obtienen los siguientes datos:
 - ✓ Longitud de la secuencia del producto: 100 pb.
 - ✓ Número de hexanucleótidos incluidos en la secuencia de referencia: 3.
 - ✓ Secuencia de referencia sin repetidos:
$$100 \text{ pb} - (3 \text{ repetidos} \times 6 \text{ pb}) = 100 - 18 = 82 \text{ pb}$$

Por lo tanto, la expresión para saber el número de repetidos es:

$$\text{No. repetidos} = \frac{\text{Tamaño de fragmento} - 82 \text{ pb}}{6 \text{ pb}}$$

8.4 Análisis estadístico

Las variables categóricas se presentan como números absolutos y frecuencias, mientras que las variables continuas se presentan como promedios y rangos. La distribución normal se evaluó utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para el análisis de variables continuas se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, o rho de Spearman, según fuera el caso). Las variables categóricas se compararon utilizando la prueba exacta de Fisher. Las pruebas se realizaron en el ambiente Rstudio, utilizando la librería ggpubr.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Electroforesis de productos de la PCR de triple cebador

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis. El corrimiento mostró, en su mayoría, 1 o 2 bandas con un peso molecular entre los 80-170 pb como se muestra en la figura 18.

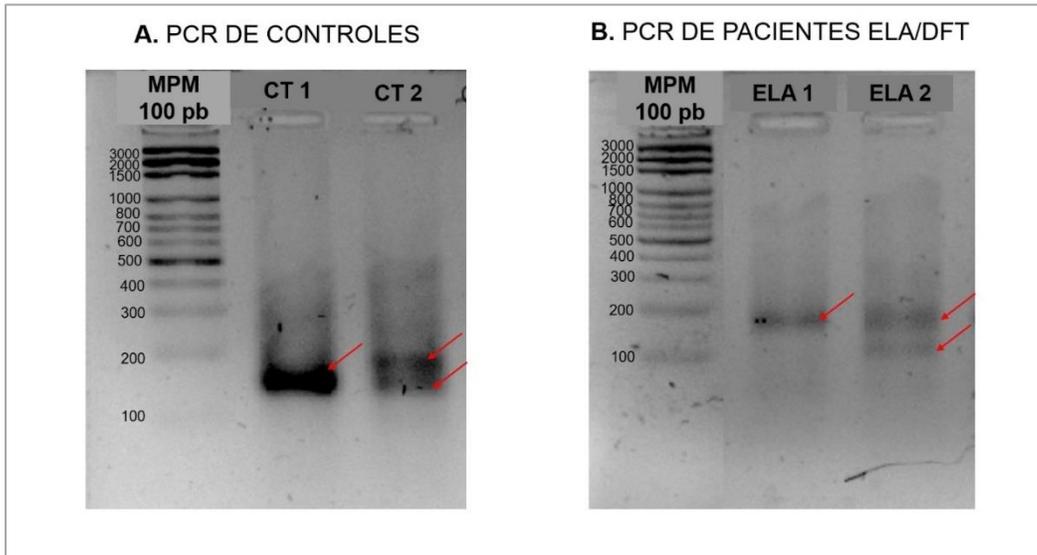


Figura 18. PCR del hexanucleótido de C9ORF72. Se muestra la electroforesis de los productos de PCR de dos controles sanos (A) y de dos pacientes de ELA/DFT (B); se indican con flechas color rojo las bandas detectadas. Los productos CT 1 y ELA 1 muestran solo una banda (homocigotos), mientras que los productos CT 2 y ELA 2 muestran más de una banda (heterocigotos).

Los productos de PCR que mostraron solo una banda podrían ser homocigotos, sin embargo, ambos alelos pueden tener una diferencia mínima y ser heterocigoto debido a la baja resolución que se tiene en geles de agarosa, pero este muestreo permitió hacer un tamizaje inicial (Figura 19B).

Los microsatélites son secuencias cortas de DNA altamente polimórficas (1- 6 pb) que se repiten varias veces seguidas en una región genómica determinada y que poseen más de 70% de heterocigocidad; es por ello el número de repetidos usualmente varían entre los individuos de una población ([National Human Genome Research Institute, 2023](#); [Zauza-Carrasco, F. et al., 2015](#)). El hexanucleótido repetido es un microsatélite y, por ende, es de esperar que usualmente se presente como heterocigoto en los individuos.

9.2 Número de hexanucleótidos repetidos

Una vez establecidas las condiciones para realizar el análisis de fragmentos, este se realizó en todos los productos de PCR y fue posible determinar el número de hexanucleótidos repetidos. Se pudo establecer una correlación con la mayoría de los resultados del tamizaje en geles con el análisis de fragmentos como se muestra en los siguientes electroferogramas y geles (Figura 19). Se observó en la mayoría de los electroferogramas de controles y pacientes un pico inespecífico a ~233 pb.

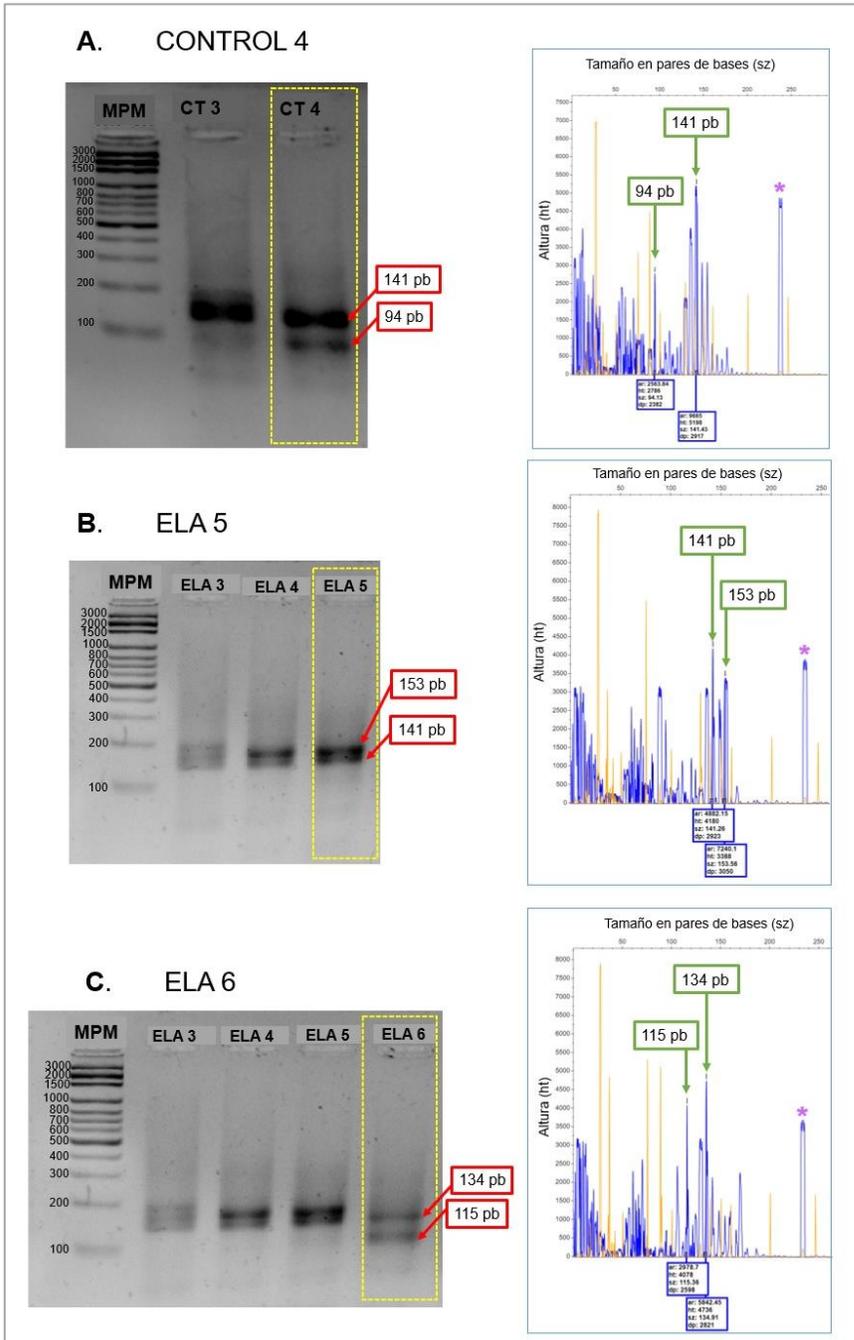


Figura 19. Correlación de resultados para determinación de HR en C9ORF72.

Se observan tres muestras: de un control heterocigoto (A) y dos pacientes heterocigotos (B, C) con sus respectivos resultados en electroforesis y análisis de fragmentos. Se señalan con flechas rojas las bandas en los geles y con flechas verdes los picos de los electroferogramas, además se señala con un asterisco morado el pico inespecífico a ~233 pb. Se destaca la correlación numérica entre ambas técnicas para cada muestra analizada.

9.2.1 En grupo control sano

Al evaluarse los 120 alelos correspondientes a los 60 individuos sanos se encontró que la población mexicana evaluada presentó desde 1 y hasta 24 hexanucleótidos repetidos (Tabla 12 y Figura 20), siendo el promedio 9 repetidos. Ningún control presentó 30 o más hexanucleótidos. En el gráfico se aprecia que hay un comportamiento multimodal, dado que los alelos de 2 y 10 HR son los que se presentaron con más frecuencia. Cabe resaltar que el 60% de los alelos evaluados fueron igual o superiores a 10 hexanucleótidos, esto quiere decir que la mayoría de los alelos son repetidos intermedios (10-30 G₄C₂).

Al analizar los resultados por género (Tabla 12), se encuentra que tanto hombres como mujeres presentan promedios iguales, indicando que no existen diferencias entre ambos géneros. El rango de las mujeres es más amplio debido a que una de ellas presentó 24 repetidos. No se encontró diferencia significativa entre el número de repetidos de acuerdo con el género ($p=0.91$, U de Mann-Whitney) ni entre los tres grupos de edad evaluados ($p=0.2125$, prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 12. Datos estadísticos de los hexanucleótidos del grupo control sano.

Población		No. alelos evaluados	Número de hexanucleótidos repetidos	
			Rango	Promedio
Grupo control (n=60)		120	1 – 24	9
Por género	Mujeres (n=30)	60	1 – 24	9
	Hombres (n=30)	60	1 – 17	9
Por edad (años)	18 a 38 (n=20)	40	1 – 17	10
	39 a 59 (n=20)	40	1 – 16	8
	60 a 80 (n=20)	40	1 – 24	10

Nota: Se muestran el rango y promedio de los HR del grupo control: en general, por género y por edad.

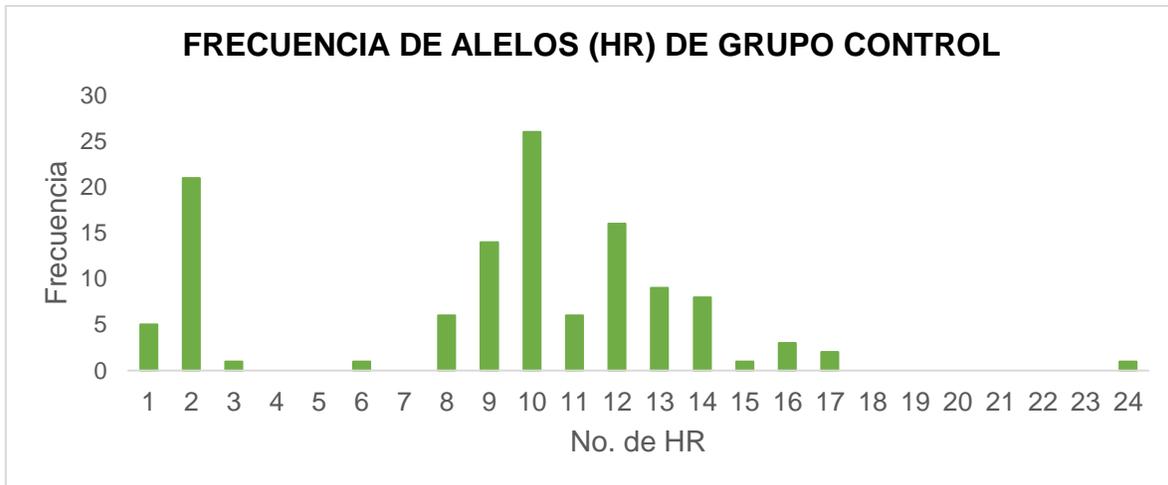


Figura 20. Distribución de la frecuencia de HR de C9ORF72 en el grupo control sano. Se presenta la distribución de la frecuencia de los alelos de hexanucleótidos repetidos de 60 individuos sanos (120 alelos).

9.2.2 En grupo de pacientes con ELA

En los 157 pacientes ELA y ELA/DFT se evaluaron 314 alelos, de los cuales el 87.26% fueron alelos no afectados (normales) y el 12.74% mostraron hexanucleótidos expandidos (Figura 21).

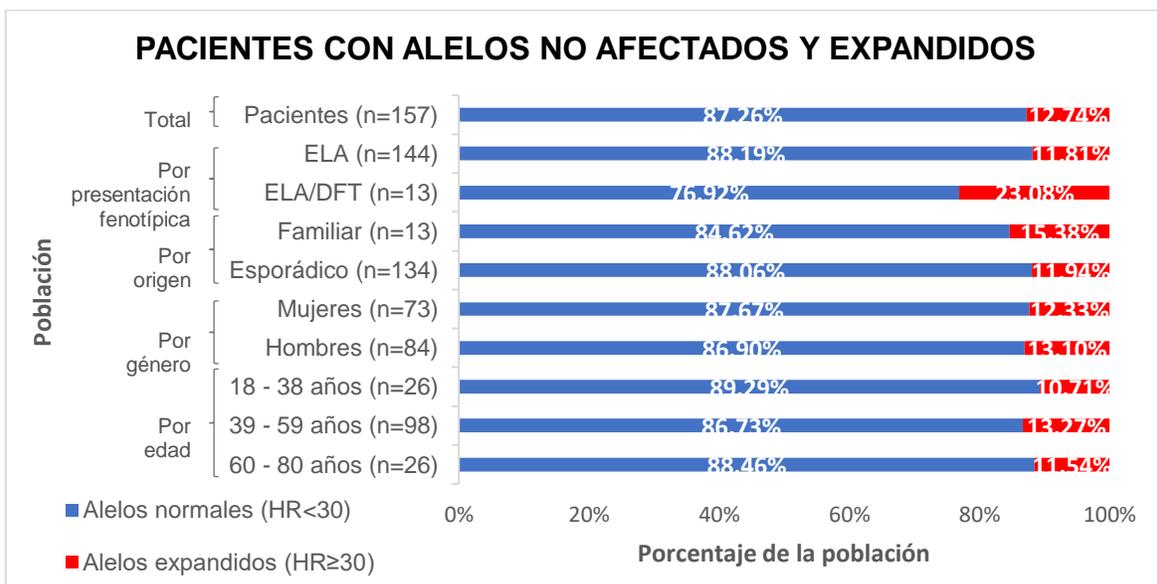


Figura 21. Pacientes con alelos no afectados y expandidos de C9ORF72. Se muestran la proporción de individuos con HR silvestres/ no afectados (normales) y expandidos en el grupo de pacientes: en general, por presentación fenotípica, por AHF, por género y por edad.

El grupo de pacientes con alelos no afectados (silvestres) presentaron desde 1 hasta 26 repetidos, siendo el promedio 9 HR. Mientras aquellos pacientes que sí presentaron hexanucleótidos expandidos, mostraron un rango de 31 a 66 repetidos, con un promedio de 46 repetidos (Tabla 13). La presencia de alelos expandidos no fue distinta de acuerdo a la presentación fenotípica ($p=0.48$), el origen de la enfermedad ($p=0.67$), al género del paciente ($p=1.00$), ni el grupo de edad ($p=0.93$). Estos datos son solo informativos, ya que la correlación genotipo-fenotipo está clara, los pacientes tienen mayor número de repetidos y eso tiene que ver con función y no por resultados estadísticos.

Tabla 13. Datos estadísticos de los hexanucleótidos del grupo de pacientes.

Población		No. de alelos evaluados	Número de hexanucleótidos repetidos					
			Alelos silvestres (HR < 30)			Alelos expandidos (HR ≥ 30)		
			No. de alelos silvestres	Rango	Promedio	No. de alelos expandidos	Rango	Promedio
Pacientes (n=157)		314	294	1 - 26	9	20	31 - 66	46
Por presentación fenotípica	ELA (n=144)	288	271	1 - 21	9	17	31 - 66	46
	ELA/DFT (n=13)	26	23	1 - 26	9	3	40 - 47	44
Por origen	Familiar (n=13)	26	24	1 - 21	8	2	36 - 60	48
	Esporádico (n=134)	268	252	1 - 26	9	16	31 - 66	46
Por género	Mujeres (n=73)	146	137	1 - 18	9	9	31 - 66	47
	Hombres (n=84)	168	157	1 - 26	9	11	32 - 55	44
Por edad (años)	18 a 38 (n=28)	56	53	1 - 18	10	3	41 - 48	46
	39 a 59 (n=98)	196	183	1 - 26	9	13	31 - 66	47
	60 a 80 (n=26)	52	49	1 - 18	10	3	32 - 48	41

Nota: Se muestran el rango y las medidas de tendencia central de los HR del grupo de pacientes: en general, por presentación fenotípica, por AHF, por género y por edad.

En la Figura 22, se puede observar un comportamiento multimodal en el gráfico dado que los alelos de 9, 12 y 1 repetidos son los más frecuentes. Cabe resaltar que 20 alelos fueron determinados con más de 30 hexanucleótidos. Además, el 44.59% de los 314 alelos se mostraron como repetidos intermedios. Dada la controversia que existe en la patogenicidad de alelos repetidos mayores a 20, comparamos el número de individuos que presentaban repetidos >20 entre los pacientes y controles incluidos en el estudio. Encontramos que había una diferencia significativa (22 pacientes de 157 vs 1 individuo control de 60, $p = 0.006$, Prueba exacta de Fisher) que condicionaba a un riesgo de padecer la enfermedad cuando se presentaba al menos un alelo repetido >20 (OR=9.61, intervalo de confianza 95%= 1.27-73.01)

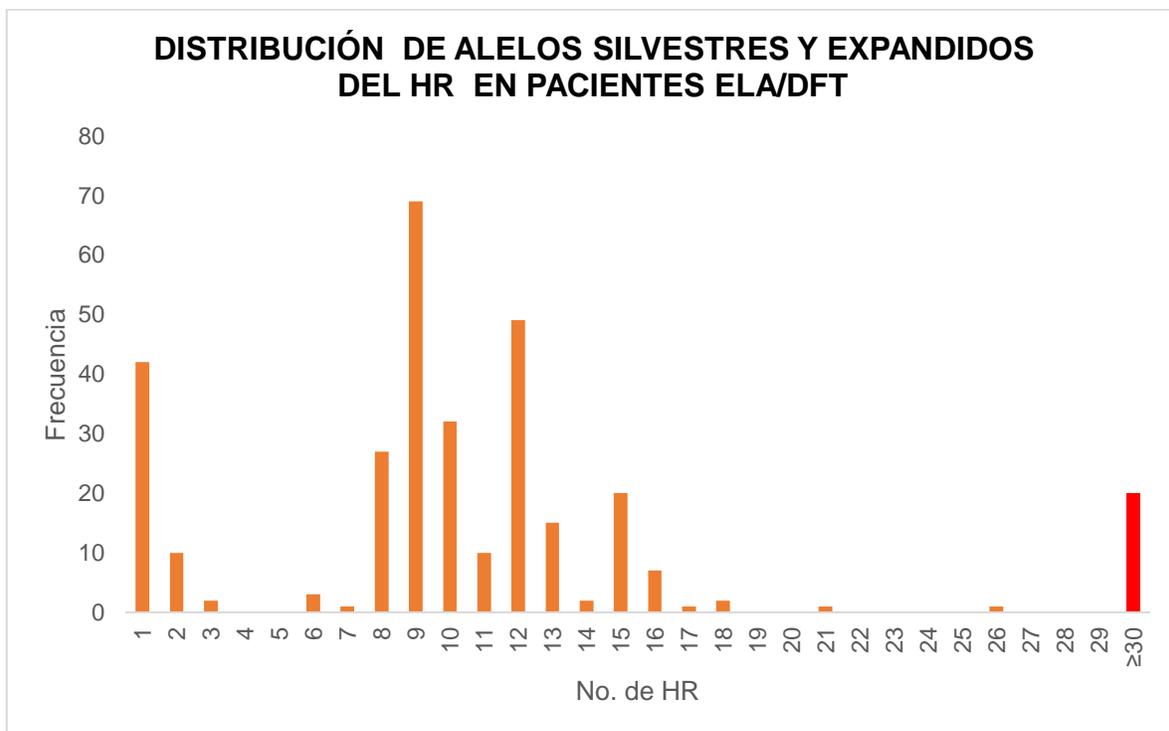


Figura 22. Distribución de la frecuencia de HR silvestres y expandidos de C9ORF72 en el grupo de pacientes. Se presenta la distribución de la frecuencia de los alelos de hexanucleótidos repetidos de los 157 pacientes (314 alelos). En color rojo se indican la frecuencia de alelos expandidos en pacientes que presentaron igual o más de 30 hexanucleótidos.

Al analizar la distribución de los alelos de acuerdo con la presentación fenotípica de la enfermedad, se observó que el grupo de los pacientes con el espectro ELA/DFT tuvo un mayor porcentaje de alelos expandidos (23.08%) comparado con el grupo de pacientes que presentaron solamente ELA (11.81%) (Figura 21).

Por antecedentes heredofamiliares (AHF), es posible notar que los alelos de los pacientes con origen familiar presentaron un mayor porcentaje de expandidos (15.38%), respecto a los pacientes con origen esporádico (11.94%).

De igual manera los alelos expandidos de los pacientes masculinos mostraron una proporción diferente (13.10%) en comparación con los alelos de las pacientes femeninas (12.33%) (Figura 21).

Por grupo de edad, los pacientes entre 39 y 59 años fueron los más frecuentes en la población de estudio. Asimismo, este grupo de 39 a 59 años mostró un mayor porcentaje de alelos expandidos respecto a los otros dos grupos de edad. El grupo de pacientes de 60 a 80 años presentaron una mayor proporción de alelos expandidos (11.54%) que en el grupo de pacientes de 18 a 39 años (10.71%).

En los diferentes subgrupos de estudio (por presentación fenotípica, AHF, género y edad) se observa que es mayor la proporción de alelos no afectados (o silvestres) con respecto a los alelos expandidos. Tanto el rango como el promedio de los alelos silvestres en los diferentes subgrupos de estudios (Tabla 13) fueron similares entre sí. No obstante, en los alelos expandidos, aunque el promedio es similar entre las diferentes subpoblaciones, el rango varía y es atribuido por los pocos casos de alelos mayores a 30 repetidos.

9.2.2.1 Expandidos del hexanucleótido repetido.

Se determinaron los HRE por medio de análisis de fragmentos, tomando como consideración que los picos definidos mayores a 260 pb representaban alelos expandidos (Figura 23). En algunos electroferogramas con HRE se podía apreciar un característico patrón de tartamudeo conocido como “dientes de sierra” o

“sawtooth” que es considerado como evidencia de una expansión patogénica (Bourinaris, T. y Houlden, H., 2018; Beck, J. et al., 2013; Kertesz, A. et al., 2013).

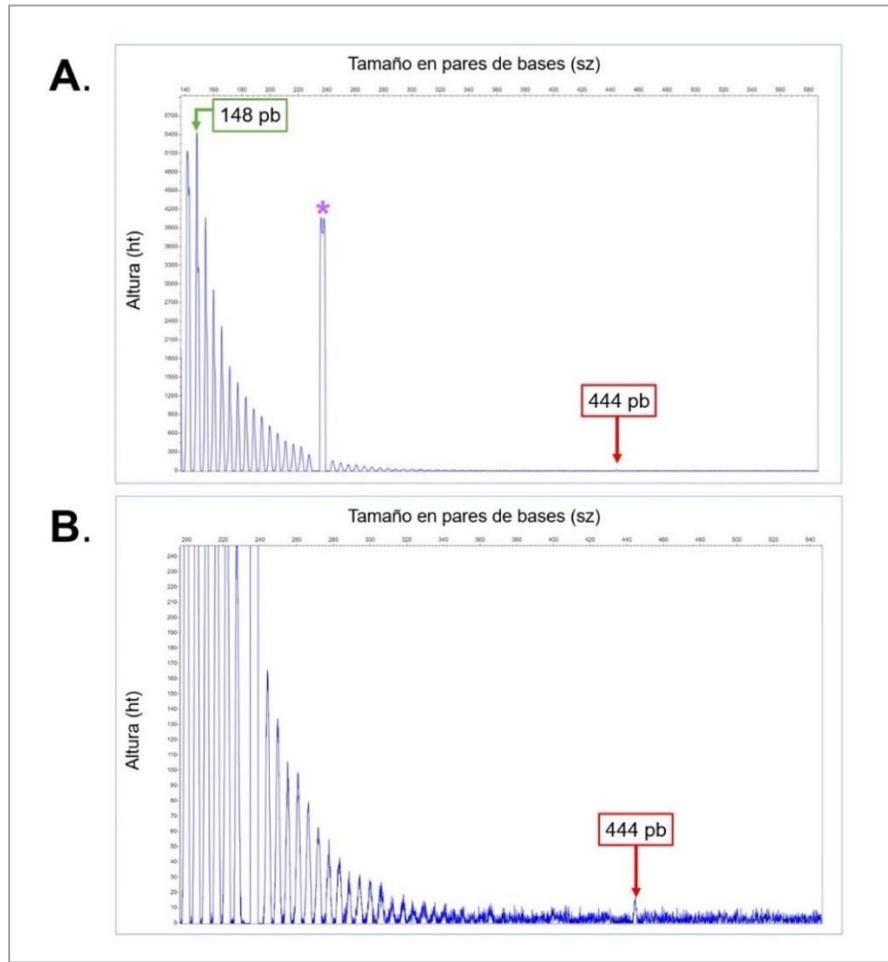


Figura 23. Detección de HRE en paciente heterocigoto. Se muestra el electroferograma (A) de un paciente con ELA que presentó un alelo normal de 148 pb (flecha verde) y un alelo expandido de 444 pb (flecha roja); con un asterisco morado se señala el pico inespecífico de ~233 pb. Al realizar un aumento del mismo electroferograma (B) es posible apreciar el alelo expandido. Se observa el característico patrón de tartamudeo “dientes de sierra”.

Del grupo de pacientes (n=157) solo 20 de ellos (12.74%) mostraron un alelo expandido. Todos los pacientes con HRE fueron heterocigotos. La distribución de los alelos expandidos fue 31 a 66 hexanucleótidos, siendo el promedio 46 repetidos. El alelo de 48 HR fue el más frecuente (Figura 24).

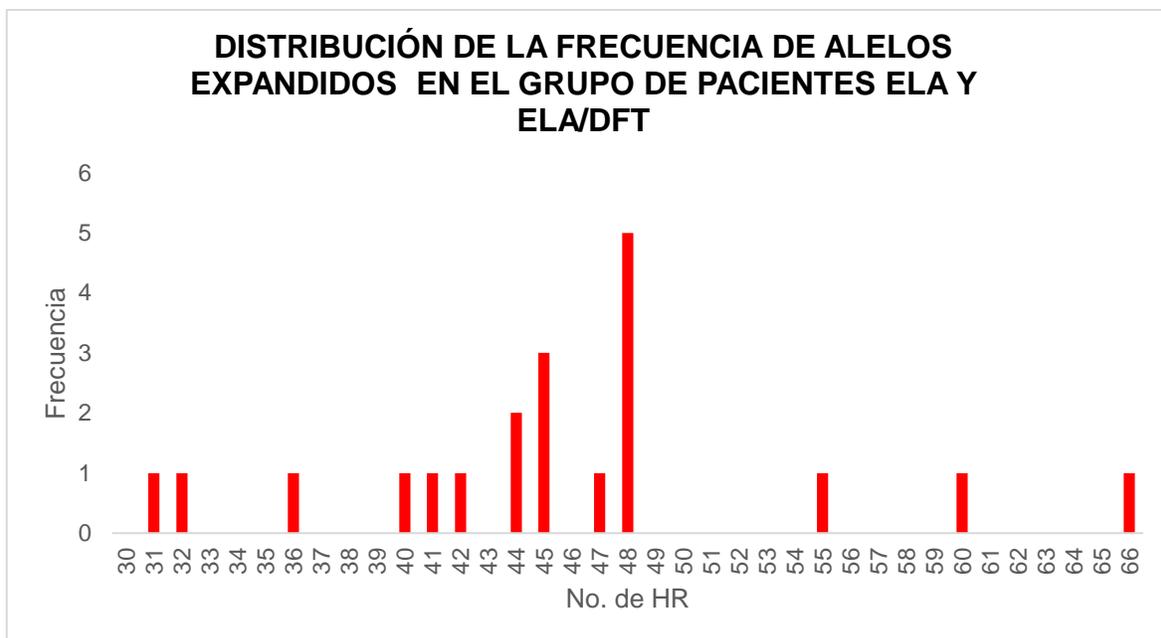


Figura 24. *Distribución de los hexanucleótidos repetidos expandidos.* Se muestra la distribución de la frecuencia de los alelos de hexanucleótidos repetidos expandidos correspondientes a 20 pacientes (40 alelos).

Algunos pacientes que presentaron HRE exhibieron por lo menos un fenotipo característico de la expansión (Apéndice B), entre los que se encuentran:

- ELA/DFT
- ELA familiar
- ELA bulbar
- ELA de inicio juvenil
- ELA de evolución lenta
- ELA asociada a Vulpian-Bernhardt
- ELA espinal
- Parkinsonismo

Tanto el ELA/DFT, ELAf, ELA bulbar, ELA juvenil y parkinsonismo ya se han reportado en diversas publicaciones como fenotipos característicos del hexanucleótido expandido (Smeyers, J. et al., 2021; Ticozzi, N., 2017; Souza, P. et

al., 2015; Bourinaris, T. y Houlden, H., 2018). Además, se encontraron 2 portadores del expandido cuyo único fenotipo fue ELA de inicio espinal (braquial).

Lo anterior tiene relevancia pues hay estudios que indican que los portadores de la expansión con inicio bulbar o con mayor edad en el inicio de la enfermedad, tienden a tener un tiempo de sobrevivencia corto (Ticozzi, N., 2017; Glasmacher, S.A. et al., 2019),

En este estudio se encontraron 3 pacientes de evolución lenta con el HRE; uno de estos pacientes corresponde a la variante Vulpian-Bernhardt con un inicio juvenil.

El mecanismo patológico de los HRE depende del tiempo por la acumulación de productos tóxicos (RNA y DPRs), entonces al rebasar el umbral o concentración, estos productos y sus efectos son más tóxicos para las células y tejidos (Ross, J.P. et al., 2019).

Como ya se mencionó en el *C9ORF72* también pueden existir casos de penetrancia incompleta (Bourinaris, T. y Houlden, H., 2018). Consecuentemente, en este estudio aquellos portadores de la expansión no presentaron algún fenotipo característico debido a que el umbral de toxicidad no se ha alcanzado o *C9ORF72* no era la causa de la enfermedad y podría ser otro gen la causa, recordando que hay más de 30 genes involucrados en el desarrollo de la patología.

De igual modo, se ha planteado la hipótesis que la manifestación clínica de la enfermedad también puede depender del tamaño de la expansión de la repetición o la presencia de interrupciones en la secuencia de los repetidos (Gijssels, I. et al., 2015).

Es frecuente encontrar en la literatura que la secuencia de DNA en cada célula nucleada de un organismo es idéntica, sin embargo, para el desarrollo de un humano adulto se necesitan múltiples mitosis (aproximadamente $\sim 10^{16}$), y cada una de ellas implica un riesgo de errores en los múltiples eventos de transcripción y división celular para la formación y desarrollo de un individuo. La mayoría de esos errores son fenotípicamente silenciosos y solo un mínimo de estos eventos

mutacionales afecta la salud del individuo (Queremel Milani, D.A. y Chauhan P.R., 2022; Notini, A.J. et al., 2008).

Se ha reportado que el hexanucleótido repetido de *C9ORF72* posee heterogeneidad somática que sugiere un grado de inestabilidad dentro de la repetición (Smeyers, J. et al., 2021; Trageser, K.J., et al., 2019; Cooper-Knock, J. et al., 2014), esto quiere decir que existe una variabilidad en el tamaño de los repetidos: tanto en los diferentes tejidos como en una misma población de células, de hecho, algunos autores lo describen como mosaicismo (Cooper-Knock, J. et al., 2014; Ebbert, M.T.W. et al., 2018; Gijssels, I. et al., 2015).

Es importante destacar que en distintas publicaciones se ha discutido una inestabilidad somática de la repetición G_4C_2 : el número de hexanucleótidos repetidos que hay en células sanguíneas no es el mismo que en otros tejidos como el cerebro. Se han identificado sujetos que cuentan con una repetición intermedia en el DNA de células de sangre, pero con grandes expansiones en el SNC (Balendra, R. e Isaacs, A.M., 2018; Leija-Salazar et al., 2018; Jiang, J. y Ravits, J., 2019; Cooper-Knock, J. et al., 2014).

En un estudio donde se analizaron los repetidos en cerebelo, cerebro y sangre de los pacientes, se encontró que en los tres tejidos había HRE, no obstante, el número de repetidos expandidos variaban en los tres tejidos del mismo individuo (Pamphlett, R. et al., 2013).

Se ha propuesto que más de 50 repetidos detectados en DNA sanguíneo se pueden asociar con expansiones muy largas en el SNC (Balendra, R. e Isaacs, A.M., 2018). Algunos autores sugieren que las repeticiones largas en ciertos tejidos del SNC tienen un impacto en el inicio y duración de la enfermedad del paciente (Van Blitterswijk, M. et al., 2013), otros autores plantean la hipótesis de que, independientemente del tejido, no hay correlación significativa entre la longitud de la expansión y los fenotipos de los pacientes (Cooper-Knock, J. et al., 2014).

Dado el desafío técnico que implica determinar el repetido G_4C_2 , existen diversas metodologías para poder analizarlo. Desde el descubrimiento del HRE de

C9ORF72, la PCR de triple cebador ha demostrado ser una técnica útil para encontrar pequeñas expansiones, empero tiene el límite de detección de ~60 repetidos. Como ya se mencionó, en sangre es útil esta técnica como tamizaje para identificar aquellos pacientes cuyo expandido podría ser mayor en SNC. Sin embargo, sería difícil implementar esta PCR para la determinación en tejidos neurales. Por otro lado, una de las técnicas que es frecuentemente usada para la determinación de grandes expandidos es la hibridación tipo *Southern*, aun así, la desventaja es que requiere una mayor cantidad de DNA genómico para realizarla y polimerasas que permitan amplificar fragmentos más largos y metodológicamente es más complicada y requiere de mayor tiempo. Recientemente se ha lanzado al mercado un kit de PCR para detección precisa de expandidos: AmplideX® PCR/CE *C9orf72* (Asuragen), sin embargo, el costo no es tan accesible.

Con lo anterior, se puede inferir que la determinación precisa del hexanucleótido es desafiante pues es importante tanto la técnica a utilizar, como el tejido para analizar. Aunque los tejidos del SNC pueden dar un diagnóstico más certero de una expansión, esta solo puede ser hecha *post-mortem*.

El análisis en sangre es útil para el diagnóstico de certeza, abre posibilidades de tratamiento, así como de un asesoramiento genético oportuno para el paciente y sus familiares a los cuales se les podrá informar de los riesgos de ser portadores de la enfermedad. Por lo que se buscan las mejores estrategias metodológicas con mayor sensibilidad y reproducibilidad, pero sobre todo que estén disponibles para un mayor número de pacientes y puedan las diferentes metodologías complementarse para dar un resultado más preciso cuando se analicen células sanguíneas.

9.2.3 Comparación entre grupo control sano y grupo de pacientes con ELA

Al comparar los datos de número de HR entre el grupo control y el grupo de pacientes (Tabla 14), se observa que solo el grupo de pacientes presenta repetidos expandidos y el grupo de pacientes ELA/DFT muestra la mayor proporción de alelos

expandidos (23.08%). Al comparar los alelos silvestres de controles y pacientes en sus respectivos grupos, estos son similares.

Tabla 14. Número de repetidos de los grupos de controles sanos y de pacientes.

Población			No. de sujetos evaluados (n)	Número de hexanucleótidos repetidos			
				Alelos silvestres (HR < 30)		Alelos expandidos (HR ≥ 30)	
				Promedio y rango	Proporción de la población	Promedio y rango	Proporción de la población
Grupo control sano			60	9 (1–24)	100.00%	-	0%
Grupo de pacientes	En general		157	9 (1–26)	87.26%	46 (31–66)	12.74%
	ELA		144	9 (1–21)	88.19%	46 (31–66)	11.81%
	ELA/DFT		13	9 (1–26)	76.92%	44 (40–47)	23.08%
Por género	Mujeres	CT	30	9 (1–24)	100.00%	-	0%
		Pac.	73	9 (1–18)	87.67%	47 (31–66)	12.33%
	Hombres	CT	30	9 (1–17)	100.00%	-	0%
		Pac.	84	9 (1–26)	86.90%	44 (32–55)	13.10%
Por edad	18 a 38 años	CT	20	10 (1–17)	100.00%	-	0%
		Pac.	28	10 (1–18)	89.29%	46 (41–48)	10.71%
	39 a 59 años	CT	20	8 (1–16)	100.00%	-	0%
		Pac.	98	9 (1–26)	86.73%	47 (31–66)	13.27%
	60 a 80 años	CT	20	10 (1–24)	100.00%	-	0%
		Pac.	26	10 (1–18)	88.46%	41 (32–48)	11.54%

Nota: Se muestran el promedio y rango de los hexanucleótidos repetidos no afectados (silvestres) y expandidos tanto de controles sanos (CT) como pacientes (Pac.), así como la respectiva proporción de la población.

La figura 25 muestra la distribución de los alelos silvestres y expandidos en los grupos control sano y de pacientes; esta distribución entre alelos silvestres es similar y solo en el grupo de pacientes se observaron alelos expandidos (HR≥30).

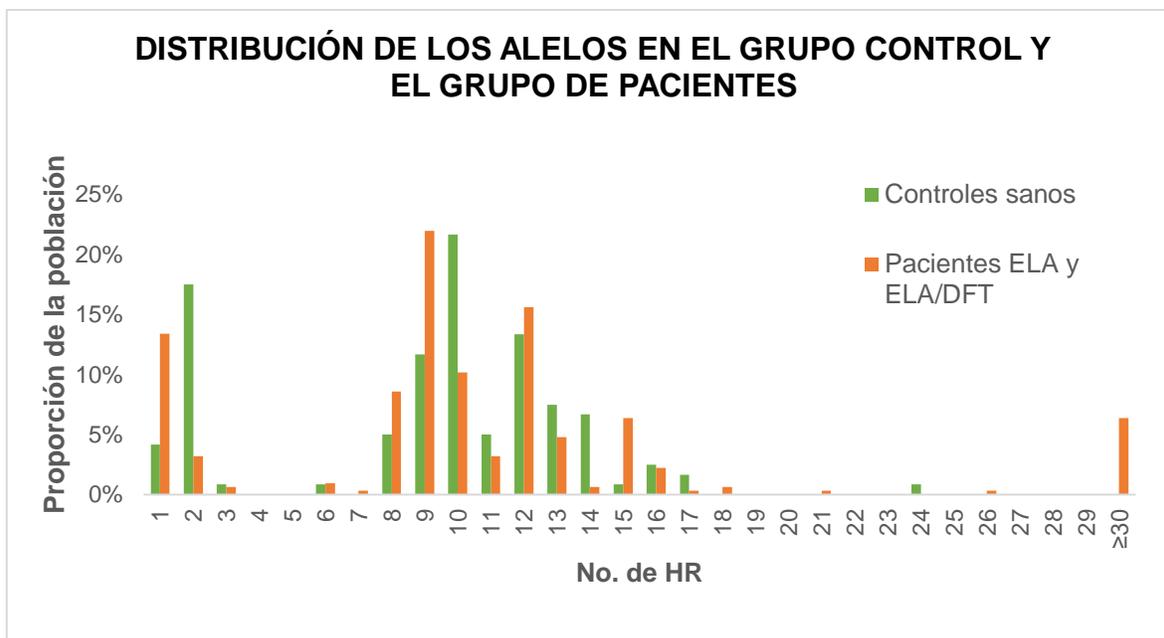


Figura 25. Distribución de los alelos (HR) en el grupo control y en el grupo de pacientes ELA y ELA/DFT. Se observa distribución de la proporción de alelos de cada grupo de estudio.

9.2.4 Comparación de la distribución de alelos de la población mexicana con otras poblaciones

Al comparar los resultados de la población sana del presente estudio con aquellos obtenidos en otros países (Tabla 15), se muestra que el alelo de 2 repetidos es el más frecuente en la mayoría de las poblaciones estudiadas y está presente en los países hispanos reportados (México, España y Argentina). Por otro lado, los repetidos de 5 y 8 hexanucleótidos también son frecuentes en diversos países alrededor del mundo. Interesantemente, México también presenta como alelo frecuente de 10 HR, el cual es mayor a la moda de las demás poblaciones.

Las poblaciones caucásicas y la afroamericanas, presentaron una media de ~7 repetidos, mientras que las poblaciones asiáticas reportan un promedio desde 4 hasta 9 hexanucleótidos. La media de México (9 HR) está por encima del promedio de las demás poblaciones, pero similar a las poblaciones chinas.

Tabla 15. Número de hexanucleótidos repetidos en diferentes poblaciones del mundo: en individuos sanos y en pacientes sin HRE.

Lugar	Población	No. de sujetos evaluados	No. de HR			Referencia	
			Moda	Promedio	Rango		
México	CT	60	2/ 10	9.0	1 – 24	Actual	
	Pac.	157	1/ 9/ 12	9.0	1 – 26		
España	CT	248	2/ 4	NR	2 – 21	García-Redondo, A. et al., 2012	
	Pac.	936	2 /4	NR	2 – 28		
Argentina	CT	73	2/ 5/ 8	NR	2–18	Itzcovich, T. et al., 2016	
	Pac.	50	2/ 5/ 8	NR	2–19		
EUA	Caucásicos	CT	1144	≤4/ 5/ 8	6.9	≤4 – 23	Nuytemans, K. et al., 2013
	Afroamericanos	CT	620	≤4/ 6	6.8	≤4 – 22	Kohli, M.A. et al., 2013
Reino Unido	CT	7579 (*11 CT HRE)	2/ 5/ 8	NR	1 – 32	Beck, J. et al., 2013.	
Taiwan	CT	323	3/ 8	NR	3 – 13	Hsiao, C.T. et al., 2014	
	CT	485	2/ 7	4.3	2 – 21	Lin, C.H. et al., 2014	
China	CT	314	2/ 7	5.3	2 – 11	Jiao, B. et al., 2013	
	CT	632	2/ 6/ 7	8.5 y 5.2	2 – 18	Chen, Y. et al., 2015	
	Pac	918	2/ 7	9.3 y 5.1	1 – 23		
India	CT	357	2/ 4/ 5	3.9	2 – 18	Shamim, U. et al., 2020	
	Pac.	558	2/ 4	3.8	2 – 18		
Europa	CT	1039	≤4/ 5/ 8	7.1	≤4 – 23	Kohli, M.A. et al., 2013	
Mundial	CT	5478 (*1 CT HRE)	0-2 /5 /8	NR	0 – 32	Theuns, J. et al., 2014	

Nota: Se muestran el rango y promedio de los HR en individuos sanos (CT) y pacientes sin expandidos (Pac.), de distintos países. NR= No reportado. *CT HRE=No. de controles que mostraron expandidos.

En la mayoría de las poblaciones, el rango varía desde 2 hasta 24 hexanucleótidos repetidos. Cabe mencionar que se han reportado controles sanos con expandidos (Beck, J. et al., 2013; Theuns, J. et al., 2014); al analizar estos casos mediante la hibridación tipo *Southern* se encontró que eran indistinguibles los expandidos de controles sanos y de pacientes *C9ORF72* positivos (Beck, J. et al., 2013).

Por otro lado, al comparar la frecuencia del HRE en las diferentes poblaciones del mundo (Tabla 16), es posible notar que México está por arriba de la media mundial de % ELA con *C9ORF72* positivo, y solo Finlandia lo supera. En las poblaciones hispanas, hay una mayor proporción de pacientes con ELAf que son portadores del expandido; México tiene una mayor proporción de pacientes ELAs con HRE respecto a los demás países, puede que estos pacientes aparentemente esporádicos sí tengan antecedentes heredofamiliares, pero lo desconocen o no lo informaron al momento de su evaluación.

Algunas poblaciones de pacientes caucásicos *C9ORF72* positivos con ELA familiar o con ELA/DFT son mayores que las proporciones que presenta México, por ejemplo, Finlandia, quien presenta los mayores porcentajes en cada una de las categorías de la Tabla 16. Además, es notorio que en las poblaciones asiáticas, africanas y nativo-americanas (EUA) hay un porcentaje bajo o nulo de pacientes con expandidos.

Tabla 16. Casos de hexanucleótidos repetidos expandidos en diferentes poblaciones de pacientes ELA y ELA/DFT del mundo.

Lugar	No. Pac.	ELAf (%)	%De pacientes con HRE				Referencia
			Total	ELAs	ELAf	ELA/DFT	
México	157	8.8	12.7	11.9	15.4	23.1	Actual
Cuba	115	15.8	1.7	2.1	0	NR	Ryan, M. et al., 2019
Brasil	228	17.1	4.4	2.6	12.8	NR	Chadi, G. et al., 2016
Argentina	50	6	4.0	2.1	33.3	NR	Itzcovich, T. et al., 2016
España	936	16.6	7.2	3.2	27.1	16.8	García-Redondo, A., et al., 2012
EUA y Canadá (latinos)	33	NR	6.1	NR	NR	NR	Mesaros, M. et al., 2021
EUA (hispanos)	72	0	8.3	8.3	0	NR	Majounie, E. et al., 2012
EUA (nativo-americanos)	3	0	0	0	0	NR	Majounie, E. et al., 2012
EUA (afro-americanos)	49	0	4.1	4.1	0	NR	Majounie, E. et al., 2012
USA	1177	13.8	9.8	5.5	36.2	NR	Majounie, E. et al., 2012
Sudáfrica	143	2.0	4.9	7	0	NR	Nel, M. et al., 2019
Reino Unido	1014	9.7	10.6	6.8	45.9	NR	Cruts, M. et al., 2013
Finlandia	815	25	31	23	58	70	Laaksovirta, H. et al., 2022
Australia	43	0	4.7	4.7	0	50	Pamphlett, R. et al., 2012
	616	0	6.7	6.7	0	NR	McCann, E.P. et al., 2019.
India	593	4.7	3.2	2.8	10.7	5.9	Shamin, U. et al., 2020
China	918	0	0.9	0.9	0	0	Chen, Y. et al., 2016
Japón	563	2.0	0.4	0.4	0	NR	Ogaki, K. et al., 2012
Corea	254	3.1	0	0	0	NR	Jang, J. et al., 2013
Mundial	4448	13.2	10.5	6.3	37.6	NR	Majounie, E. et al., 2012

Nota: Se observa los resultados de la presencia del hexanucleótido expandido en diversas poblaciones de pacientes del mundo con ELA y el espectro ELA/DFT. Se muestra el número de pacientes evaluados, así como su proporción de ELA familiar, así mismo se muestran los porcentajes de las poblaciones que presentaron HRE.

Se ha descrito que los portadores de HRE en poblaciones no relacionadas comparten un haplotipo de riesgo con efecto fundador de origen finlandés que se ha extendido a diversos lugares del mundo ([García-Redondo, A., et al., 2012](#); [Majounie, E. et al., 2012](#); [Chen, Y. et al., 2016](#)). Finlandia es una región relativamente aislada que cuenta con poblaciones genéticamente homogéneas que se originaron a partir de un pequeño grupo de fundadores; la deriva génica ha impactado en las frecuencias alélicas de esta población y así se explicaría la alta incidencia de las expansiones *C9ORF72* en esta región. Se ha propuesto que el haplotipo fundador podría simplificarse a una sola variante génica: el SNV rs3849942-T ([Majounie, E. et al., 2012](#); [Reus, L.M. et al., 2021](#)). Por otro lado, hay publicaciones que encontraron expandidos en haplotipos no relacionados entre sí, sugiriendo que los HRE surgen de múltiples eventos mutacionales, pues los repetidos silvestres (normales) largos son inestables y han generado expansiones muchas veces en la historia humana y en esto radica la importancia de conocer la distribución de silvestres (no afectados o normales) de la población mexicana, ya que la presencia de alelos sanos grandes por la misma inestabilidad del repetido puede expandirse en generaciones sucesivas y dar origen a mutaciones *de novo* ([Nel, M. et al., 2019](#); [Beck, J. et al., 2013](#)).

X. CONCLUSIONES

Se estableció que el número de hexanucleótidos repetidos en el gen *C9ORF72* en el grupo de controles sanos fue menor a 30 repetidos, el número promedio de hexanucleótidos G4C2 en la población sana mestiza mexicana fue de 9 repetidos (rango: 1-24 HR) siendo más frecuentes los alelos de 2 y 10 hexanucleótidos.

Se determinó que en la muestra de 157 pacientes ELA, el 87.3% presentó alelos silvestres con un promedio de 9 repetidos (rango: 1-26 HR), siendo los alelos de mayor frecuencia 1, 10 y 12 hexanucleótidos

Se determinó que el 12.7% de la población de pacientes con ELA evaluada mostró repetidos expandidos de manera heterocigota (promedio: 46 HR, rango: 31-66 HR), sin embargo, debido a la inestabilidad del repetido asociado, es probable que esta cifra esté subestimada, pues en tejidos del SNC podrían encontrarse expansiones de mayor tamaño.

Se estableció la asociación entre los hexanucleótidos expandidos con los fenotipos ELA/DFT, ELA familiar, ELA bulbar, ELA espinal, ELA de inicio juvenil, ELA de evolución lenta, ELA asociada a la variante Vulpian-Bernhardt y/o parkinsonismo. El grupo de pacientes con la presentación ELA/DFT fueron quienes mostraron la mayor proporción de alelos expandidos. Los pacientes mexicanos evaluados presentaron una alta proporción de HRE asociados a ELA familiar, al igual que otras poblaciones hispanas reportadas.

Este fue el primer estudio del hexanucleótido G4C2 realizado en el país en población mestiza mexicana sana y en pacientes mexicanos con ELA, y al encontrar que la población de pacientes ELA y ELA/DFT con expandidos, superan a la media mundial, se establece que el *C9ORF72* es un gen importante para considerar en el diagnóstico de los pacientes mexicanos. Además, la inclusión de este método molecular en el diagnóstico de la enfermedad abre la posibilidad de que los pacientes mexicanos puedan tener acceso a un tratamiento médico oportuno y también establecer riesgos para la descendencia.

XI. PERSPECTIVAS

Dada las limitaciones de la metodología, es necesario verificar los resultados mediante otro método molecular como hibridación tipo *Southern* o estuches estandarizados comerciales. De igual manera, es conveniente ampliar el número de controles sanos y de pacientes para confirmar si la proporción del presente estudio se replica.

El *C9ORF72* no solamente está asociado a la ELA y/o DFT, por lo que sería útil analizarlo en otras enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, Parkinson, Huntington, etc.

También sería útil determinar la secuencia de aquellas muestras de pacientes que presentaron el repetido expandido pues la presencia de interrupciones puede influir en la manifestación clínica de la enfermedad.

Con la hipótesis de que las expansiones del hexanucleótido provienen de un efecto fundador finlandés, es importante analizar el haplotipo en la población mexicana mestiza sana, en la población mexicana indígena, para establecer si los expandidos en nuestro país son el resultado de la colonización y migración europea o de la inestabilidad propia del repetido.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramzon, Y.A., Fratta, P., Traynor, B.J. y Chia, R. (2020). The Overlapping Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00042>
- ActiveDriverDB'21. (2021). All isoforms for C9orf72. <https://www.activedriverdb.org/gene/show/C9orf72>
- Aktekin, M.R. y Uysal, H. (2020). Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Turkish Journal of Neurology*, 26(3), 187–196. <https://doi.org/10.4274/tnd.2020.45549>
- Almeida, S. y Gao, F. (2016)., Lost & found: C9ORF72 and the autophagy pathway in ALS/FTD. *The Embo Journal*, 35 (12), 1251-1253. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694578>
- Ao, X., Zou, L. y Wu, Y. (2014). Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. *Cell Death and Differentiation*, 21(3), 348-358. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.187>
- Aoki, Y., Manzano, R., Lee, Y., Dafinca, R., Aoki, M., Douglas, A.G.L., Varela, M.A., Sathyaprakash, C., Scaber, J., Barbagallo, P., Vader, P., Mäger, I., Ezzat, K., Turner, M.R., Ito, N., Gasco, S., Ohbayashi, N., el Andaloussi, S., Takeda, S.,... Wood, M.J.A. (2017). C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain*, 140(4), 887–897. <https://doi.org/10.1093/brain/awx024>
- Babić Leko, M., ŽUpunski, V., Kirincich, J., Smilović, D., Hortobágyi, T., Hof, P.R. y Šlmić, G. (2019). Molecular Mechanisms of Neurodegeneration Related to C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion. *Behavioural Neurology*, 2019, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2019/2909168>
- Balendra, R., Isaacs, A.M. (2018). C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nature Reviews Neurology*, 14(9), 544–558. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0047-2>
- Bamburg, J.R. y Bernstein, B.W. (2010). Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biology Reports*, 2, 62. <https://doi.org/10.3410/b2-62>
- Barber, G.N. (2015). STING: infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15 (12), 760–770. <https://doi.org/10.1038/nri3921M>
- Beck, J., Poulter, M., Hensman, D., Rohrer, J., Mahoney, C.J., Adamson, G., Campbell, T., Uphill, J., Borg, A., Fratta, P., Orrell, R., Malaspina, A., Rowe, J., Brown, J., Hodges, J., Sidle, K., Polke, J., Houlden, H., Schott, J.,... Mead, S. (2013b). Large C9orf72

Hexanucleotide Repeat Expansions Are Seen in Multiple Neurodegenerative Syndromes and Are More Frequent Than Expected in the UK Population. *The American Journal of Human Genetics*, 92(3), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.01.011>

- Beckers, J., Tharkeshwar, A.K. y van Damme, P. (2021). C9orf72 ALS-FTD: recent evidence for dysregulation of the autophagy-lysosome pathway at multiple levels. *Autophagy*, 17(11), 3306–3322. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1872189>
- Bodur, C., Kazyken, D., Huang, K., Ekim Ustunel, B., Siroky, K.A., Tooley, A.S., Gonzalez, I.E., Foley, D.H., Acosta-Jaquez, H.A., Barnes, T.M., Steinl, G.K., Cho, K., Lumeng, C.N., Riddle, S.M., Myers, M.G., y Fingar, D.C. (2017). The IKK-related kinase TBK1 activates mTORC1 directly in response to growth factors and innate immune agonists. *The EMBO Journal*, 37(1), 19–38. <https://doi.org/10.15252/emj.201696164>
- Bos, J.L., Rehmann, H. y Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 129(5), 865-877. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>
- Bourinaris, T. y Houlden, H. (2018). C9orf72 and its Relevance in Parkinsonism and Movement Disorders: A Comprehensive Review of the Literature. *Movement Disorders Clinical Practice*, 5(6), 575–585. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12677>
- Braems, E., Swinnen, B. y Van Den Bosch, L. (2020). C9orf72 loss-of-function: a trivial, stand-alone or additive mechanism in C9 ALS/FTD? *Acta Neuropathol*, 140, 625–643. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02214-x>
- Brown, C.A., Lally, C., Kupelian, V. y Flanders, W.D. (2021). Estimated Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *Neuroepidemiology*, 55(5), 342–353. <https://doi.org/10.1159/000516752>
- Brown, R.H. y Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 162–172. <https://doi.org/10.1056/nejmra1603471>
- Bucheli, M.E., Campos, M., Bermudes, D.B., Chuquimarca, J.P., Sambache, K., Cheverrez, K., Niato, J.F., Montalvo, J., Andino, A., Calero, C. y Guerrero, P. (2012). Esclerosis Lateral Amiotrófica: criterios de El Escorial y la Electromiografía en su Temprano Diagnóstico. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 21(1-3), 61-68. http://revecuatneurol.com/magazine_issue_article/esclerosis-lateral-amiotrofica-criterios-en-temprano-diagnostico/
- Byrne, S., Elamin, M., Bede, P., Shatunov, A., Walsh, C., Corr, B., Heverin, M., Jordan, N., Kenna, K., Lynch, C., McLaughlin, R.L., Iyer, P. M., O'Brien, C., Phukan, J., Wynne, B., Bokde, A. L., Bradley, D.G., Pender, N., Al-Chalabi, A. y Hardiman, O. (2012). Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72

repeat expansion: a population-based cohort study. *The Lancet Neurology*, 11(3), 232–240. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70014-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70014-5)

- Casterton, R. L., Hunt, R. J. y Fanto, M. (2020). Pathomechanism Heterogeneity in the Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Disease Spectrum: Providing Focus Through the Lens of Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2692–2713. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.02.018>
- Cedarbaum, J.M., Stambler, N., Malta, E., Fuller, C., Hilt, D., Thurmond, B. y Nakanishi, A. (1999). The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *Journal of the Neurological Sciences*, 169(1–2), 13–21. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(99\)00210-5M](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(99)00210-5M)
- Chadi, G., Maximino, J.R., Jorge, F.M.D.H., Borba, F.C.D., Gilio, J.M., Callegaro, D., Lopes, C.G., Santos, S.N.D. y Rebelo, G.N.S. (2016). Genetic analysis of patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis in a Brazilian Research Center. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18(3–4), 249–255. <https://doi.org/10.1080/21678421.2016.1254245>
- Chen, Y., Lin, Z., Chen, X., Cao, B., Wei, Q., Ou, R., Zhao, B., Song, W., Wu, Y. y Shang, H. F. (2016). Large *C9orf72* repeat expansions are seen in Chinese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 38, 217.e15-217.e22. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.016>
- Cleary, J.D., Pattamatta, A. y Ranum, L.P. (2018). Repeat-associated non-ATG (RAN) translation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(42), 16127–16141. <https://doi.org/10.1074/jbc.r118.003237>
- Cooper-Knock, J., Shaw, P.J. y Kirby, J. (2014). The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta Neuropathol* 127(3), 333–345 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1251-9>
- Cruts, M., Gijselinck, I., van Langenhove, T., Van der Zee, J. y Van Broeckhoven, C. (2013). Current insights into the *C9orf72* repeat expansion diseases of the FTL/ALS spectrum. *Trends in Neurosciences*, 36(8), 450–459. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.010>
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I., Boeve, B., Boxer, A., Baker, M., Rutherford, N., Nicholson, A., Finch, N., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y., Karydas, A., Seeley, W., Josephs, K., Coppola, G., Geschwind, D.,...Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72

Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>

- Deng, Z., Sheehan, P., Chen, S. y Yue, Z. (2017). Is amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia an autophagy disease? *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0232-6>
- Ebbert, M.T.W., Farrugia, S.L., Sens, J.P., Jansen-West, K., Gendron, T.F., Prudencio, M., McLaughlin, I.J., Bowman, B., Seetin, M., DeJesus-Hernandez, M., Jackson, J., Brown, P.H., Dickson, D.W., van Blitterswijk, M., Rademakers, R., Petrucelli, L., y Fryer, J.D. (2018). Long-read sequencing across the C9orf72 ‘GGGGCC’ repeat expansion: implications for clinical use and genetic discovery efforts in human disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0274-4>
- Echeverri, N.P. y Mockus, I. (2008). Factor nuclear κ B (NF- κ B): signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cancer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 56(2), 133-146. ISSN 0120-0011. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112008000200006
- Ensembl Genome Browser. (2021) Gene:C9orf72. Transcript: ENST00000619707.5. *Ensembl*. Recuperado el 21 de agosto del 2021 de http://Dec2021.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;q=ENSG00000147894;r=9:27535640-27573866;t=ENST00000619707
- Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A.K., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., King, A.E. y Atkin, J.D. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics*, 23(13), 3579–3595. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu068>
- Fomin, V., Richard, P., Hoque, M., Li, C., Gu, Z., Fissore-O’Leary, M., Tian, B., Prives, C. y Manley, J.L. (2018). The C9ORF72 Gene, Implicated in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia, Encodes a Protein That Functions in Control of Endothelin and Glutamate Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 38(22), e00155-18. <https://doi.org/10.1128/MCB.00155-18>
- Freibaum, B.D., Lu, Y., Lopez-Gonzalez, R., Kim, N.C., Almeida, S., Lee, K.H., Badders, N., Valentine, M., Miller, B.L., Wong, P.C., Petrucelli, L., Kim, H.J., Gao, F.B. y Taylor, J. P. (2015). GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 525(7567), 129–133. <https://doi.org/10.1038/nature14974>

- Frick, P., Sellier, C., Mackenzie, I., Cheng, C., Tahraoui-Bories, J., Martinat, C., Pasterkamp, R.J., Prudlo, J., Edbauer, D., Oulad-Abdelghani, M., Feederle, R., Charlet-Berguerand, N. y Neumann, M. (2018). Novel antibodies reveal presynaptic localization of C9orf72 protein and reduced protein levels in C9orf72 mutation carriers, *Acta Neuropathologica Communications*, 6(72). <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0579-0>
- García-Redondo, A., Dols-Icardo, O., Rojas-García, R., Esteban-Pérez, J., Cordero-Vázquez, P., Muñoz-Blanco, J.L., Catalina, I., González-Muñoz, M., Varona, L., Sarasola, E., Povedano, M., Sevilla, T., Guerrero, A., Pardo, J., de Munain, A.L., Márquez-Infante, C., de Rivera, F.J.R., Pastor, P., Jericó, I.,... Lleó, A. (2012). Analysis of the C9orf72 Gene in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in Spain and Different Populations Worldwide. *Human Mutation*, 34(1), 79–82. <https://doi.org/10.1002/humu.22211>
- Gene Cards: The human gene database. (2021). *Protein differential expression in normal tissues from HIPED for C9orf72 Gene*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=C9orf72>
- Ghasemi, M. y Brown, R.H. (2018). Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(5), a024125. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024125>
- Ghasemi, M., Keyhanian, K. y Douthwright, C. (2021). Glial Cell Dysfunction in C9orf72-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Cells*, 10(2), 249. <https://doi.org/10.3390/cells10020249>
- Gijssels, I., Van Mossevelde, S., Van Der Zee, J., Sieben, A., Engelborghs, S., De Bleecker, J., Ivanoiu, A., Deryck, O., Edbauer, D., Zhang, M., Heeman, B., Bäumer, V., Van Den Broeck, M., Mattheijssens, M., Peeters, K., Rogaeva, E., De Jonghe, P., Cras, P., Martin, J. J., ... Van Broeckhoven, C. (2015). The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Molecular Psychiatry*, 21(8), 1112–1124. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.159>
- Giménez, C., Zafra, F. y Aragón, C. (2018). Fisiopatología de los transportadores de glutamato y de glicina: nuevas dianas terapéuticas. *Revista de Neurología*, 67(12), 491–504. <https://doi.org/10.33588/rn.6712.2018067>
- Glasmacher, S.A., Wong, C., Pearson, I.E. y Pal, S. (2020). Survival and Prognostic Factors in C9orf72 Repeat Expansion Carriers. *JAMA Neurology*, 77(3), 367. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.3924>
- Gopal Krishnan, P.D., Golden, E., Woodward, E.A., Pavlos, N.J., y Blancafort, P. (2020). Rab GTPases: Emerging Oncogenes and Tumor Suppressive Regulators for the Editing of

Survival Pathways in Cancer. *Cancers*, 12(2), 259.
<https://doi.org/10.3390/cancers12020259>

- Goyal, P., Pandey, D., Brünnert, D., Hammer, E., Zygmunt, M. y Siess, W. (2013). Cofilin Oligomer Formation Occurs In Vivo and Is Regulated by Cofilin Phosphorylation. *PLOS ONE*, 8(8), e71769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071769>
- Haeusler, A.R., Donnelly, C.J. y Rothstein, J.D. (2016). The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(6), 383–395. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.38>
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E.M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P.J., Simmons, Z. y Van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- Höijer, I., Tsai, Y.C., Clark, T.A., Kotturi, P., Dahl, N., Stattin, E. L., Bondeson, M.L., Feuk, L., Gyllensten, U. y Ameer, A. (2018). Detailed analysis of HTT repeat elements in human blood using targeted amplification-free long-read sequencing. *Human Mutation*, 39(9), 1262–1272. <https://doi.org/10.1002/humu.23580>
- Hsiao, C.T., Tsai, P.C., Liao, Y.C., Lee, Y.C. y Soong, B. W. (2014). C9ORF72 repeat expansion is not a significant cause of late onset cerebellar ataxia syndrome. *Journal of the Neurological Sciences*, 347(1–2), 322–324. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.10.042>
- HUGO Gene Nomenclature Committee [HGNC]. (2020). *Symbol report for C9orf72*. https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:28337
- INEGI. (2020). Cuéntame de México: mapas para imprimir. Marco Geoestadístico Nacional. Recuperado el 13 de diciembre de 2022, de: <https://cuentame.inegi.org.mx/mapas/nacional.aspx?tema=M>
- Itzcovich, T., Xi, Z., Martinetto, H., Chrem-Méndez, P., Russo, M.J., de Ambrosi, B., Uchitel, O.D., Nogués, M., Silva, E., Rojas, G., Bagnatti, P., Amengual, A., Campos, J., Rogaeva, E., St. George-Hyslop, P., Allegri, R., Sevlever, G. y Surace, E.I. (2016). Analysis of C9orf72 in patients with frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis from Argentina. *Neurobiology of Aging*, 40, 192.e13-192.e15. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.001>
- Iyer, S., Subramanian, V. y Acharya, K.R. (2018). C9orf72, a protein associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a guanine nucleotide exchange factor. *Peer, J.*, 6, e5815. <https://doi.org/10.7717/peerj.5815>
- Jang, J.H., Kwon, M.J., Choi, W.J., Oh, K.W., Koh, S.H., Ki, C.S. y Kim, S.H. (2013). Analysis of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in Korean patients with familial

and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 34(4), 1311.e7-1311.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.004>

- Jiang, J. y Ravits, J. (2019). Pathogenic Mechanisms and Therapy Development for C9orf72 Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia. *Neurotherapeutics*, 16(4), 1115–1132. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00797-2>
- Jiao, B., Guo, J.F., Wang, Y., Yan, X.X., Zhou, L., Liu, X.Y., Zhang, F.F., Zhou, Y.F., Xia, K., Tang, B.S. y Shen, L. (2013). C9orf72 mutation is rare in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and essential tremor in China. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00164>
- Kelley, L.A. et al. (2015). *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*, *Nature Protocols* 10, 845-858. <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>
- Keon, M., Musrie, B., Dinger, M., Brennan, S.E., Santos, J. y Saksena, N.K. (2021). Destination Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 12, 392. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.596006>
- Kertesz, A., Ang, L.C., Jesso, S., MacKinley, J., Baker, M., Brown, P., Shoesmith, C., Rademakers, R. y Finger, E. C. (2013). Psychosis and Hallucinations in Frontotemporal Dementia with the C9ORF72 Mutation. *Cognitive and Behavioral Neurology*, 26(3), 146–154. <https://doi.org/10.1097/wnn.0000000000000008>
- Khan, I., y De Jesus, O. (30 de agosto de 2021). *Frontotemporal Lobe Dementia*. StatPearls. Recuperado el 29 de octubre de 2021, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559286/>
- Kiral, F.R., Kohrs, F.E., Jin, E.J., Hiesinger, P.R. (2018). Rab GTPases and Membrane Trafficking in Neurodegeneration. *Current Biology*, 28(8), R471-R486. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.010>.
- Kohli, M.A., John-Williams, K., Rajbhandary, R., Naj, A., Whitehead, P., Hamilton, K., Carney, R.M., Wright, C., Crocco, E., Gwirtzman, H.E., Lang, R., Beecham, G., Martin, E. R., Gilbert, J., Benatar, M., Small, G.W., Mash, D., Byrd, G., Haines, J.L.,... Züchner, S. (2013). Repeat expansions in the C9ORF72 gene contribute to Alzheimer's disease in Caucasians. *Neurobiology of Aging*, 34(5), 1519.e5-1519.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.003>
- Kuchitsu, Y. y Fukuda, M. (2018). Revisiting Rab7 Functions in Mammalian Autophagy: Rab7 Knockout Studies. *Cells*, 7(11), 215. <https://doi.org/10.3390/cells7110215>

- Kumar, D.R., Aslinia, F., Yale, S.H. y Mazza, J.J. (2010). Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. *Clinical Medicine & Research*, 9(1), 46–49. <https://doi.org/10.3121/cmr.2009.883>
- Kumar, V., Hasan, G. M., y Hassan, M. I. (2017). Unraveling the Role of RNA Mediated Toxicity of C9orf72 Repeats in C9-FTD/ALS. *Frontiers in neuroscience*, 11, 711. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00711>
- Laaksovirta, H., Launes, J., Jansson, L., Traynor, B. J., Kaivola, K., y Tienari, P.J. (2022). ALS in Finland. *Neurology Genetics*, 8(2), e665. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000665>
- Lai, J.D., e Ichida, J.K. (2019). C9ORF72 protein function and immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 713, 134523. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134523>
- Lall, D. y Baloh, R.H. (2017). Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3250–3258. <https://doi.org/10.1172/jci90607M>
- Leija-Salazar, M., Piette, C. y Proukakis, C. (2018). Review: Somatic mutations in neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(3), 267–285. <https://doi.org/10.1111/nan.12465>
- Lin, C.H., Chen, T.F., Chiu, M.J., Lin, H.I. y Wu, R.M. (2014). Lack of C9orf72 Repeat Expansion in Taiwanese Patients with Mixed Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Neurology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00059>
- Liu, C., Geng, Y., Miao, H., Shi, X., You, Y., Xu, N., Zhou, B. y Zhu, G. (2019). G-quadruplex structures formed by human telomeric DNA and C9orf72 hexanucleotide repeats. *Biophysical Reviews*, 11(3), 389–393. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00545-y>
- Mahboubi, H. y Stochaj, U. (2017). Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(4), 884–895. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.022>
- Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., Van Swieten, J.C., Abramzon, Y., Johnson, J.O., Sendtner, M., Pamphelett, R., Orrell, R.W., Mead, S., Sidle, K.C., Houlden, H.,... Traynor, B. J. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology*, 11(4), 323–330. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70043-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70043-1)

- Marat, A.L., Dokainish, H. y McPherson, P.S. (2011). DENN Domain Proteins: Regulators of Rab GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (16), 13791-13800. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.217067>
- Marín Sánchez, O., Vivas-Ruiz, D., Neira, M., Sandoval, G.A., Marín-Machuca, O., Rodríguez-Landauro, A.J., y Chacón, R.D. (2019). Rol de los interferones tipo I y tipo III: Una revisión de conceptos. *Revista Científica Ágora*, 6(2), e6. <https://doi.org/10.21679/arc.v6i2.133M>
- Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K.L., Mak, R., Jin, W., Fang, M.Y., Luo, E.C., Krach, F., Yang, D., Sen, A., Fulzele, A., Wozniak, J.M., Gonzalez, D.J., Kankel, M.W., Gao, F.B., Bennett, E.J., Lécuyer, E. y Yeo, G.W. (2018). Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell*, 172(3), 590–604.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.032>
- Martier, R., Liefhebber, J. M., Gracia-Osta, A., Miniarikova, J. Cuadrado-Tejedor, M., Espelosin, M., Ursua, S., Petry, H., VanDeventer, S. J., Evers, M, M. y Konstantinova, P. (2019b). Targeting RNA-Mediated Toxicity in C9orf72 ALS and/or FTD by RNAi-Based Gene Therapy. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 16: 26-37. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.001>
- Martier, R., Liefhebber, J.M., Miniarikova, J., van der Zon, T., Snapper, J., Kolder, I., Petry, H., van Deventer, S.J., Evers, M.M. y Konstantinova, P. (2019a). Artificial MicroRNAs Targeting C9orf72 Can Reduce Accumulation of Intra-nuclear Transcripts in ALS and FTD Patients. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 14, 593–608. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.010>
- Martínez H.R., Parada-Garza J.D., Meza M.E., González-Garza, M.T. y Moreno-Cuevas, J.E. (2014). Esclerosis lateral amiotrófica. Contribución de la Neurología Mexicana de 1998 a 2014. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 15(6), 355-362. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=54983>
- Masrori, P., y Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 27(10), 1918–1929. <https://doi.org/10.1111/ene.14393>
- Mayl, K., Shaw, C.E. y Lee, Y.B. (2021). Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches in C9orf72 ALS-FTD. *Biomedicines*, 9(6), 601. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060601>
- McCann, E.P., Henden, L., Fifita, J.A., Zhang, K.Y., Grima, N., Bauer, D.C., Chan Moi Fat, S., Twine, N.A., Pamphlett, R., Kiernan, M.C., Rowe, D.B., Williams, K.L. y Blair, I.P. (2020). Evidence for polygenic and oligogenic basis of Australian sporadic amyotrophic lateral

sclerosis. *Journal of Medical Genetics*, 58(2), 87–95. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2020-106866>

- McLaughlin, R.L., Kenna, K.P. y Hardiman, O. (2015). Genetics of ALS. En S.A. Schneider y J.M. Tomás Brás (Eds.), *Movement Disorder Genetics* (pp. 385-409). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17223-1_17
- Medina, A.M. y Escobar, M.I. (2002). Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 31(3). ISSN 0034-7450. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74502002000300002
- Mejzini, R., Flynn, L.L., Pitout, I.L., Fletcher, S., Wilton, S.D. y Akkari, P.A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1310. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Meléndez, A. y Levine, B. (2009). Autophagy in *C. elegans*. *WormBook*. http://www.wormbook.org/chapters/www_autophagy/autophagy.html
- Mesaros, M., Lenz, S., Lim, W., Brown, J., Drury, L. y Roggenbuck, J. (2021). Investigating the Genetic Profile of the Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia (ALS-FTD) Continuum in Patients of Diverse Race, Ethnicity and Ancestry. *Genes*, 13(1), 76. <https://doi.org/10.3390/genes13010076>
- Muscular Dystrophy Association. (2021) *Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) - Diseases*. <https://www.mda.org/disease/amyotrophic-lateral-sclerosis>
- Nassif, M., Woehlbier, U. y Manque, P.A. (2017). The Enigmatic Role of C9ORF72 in Autophagy. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00442>
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2021). *C9orf72 C9orf72-SMCR8 complex subunit [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/203228>
- National Human Genome Research Institute. (2023). Microsatellite. Genome.gov. Recuperado el 17 de abril 2023, de <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Microsatellite>
- National University of Singapore: Mechanobiology Institute (MBI). (2018). *What is Membrane Trafficking?* <https://www.mechanobio.info/what-is-the-plasma-membrane/what-is-membrane-trafficking/>
- Nel, M., Agenbag, G.M., Henning, F., Cross, H.M., Esterhuizen, A. y Heckmann, J.M. (2019). C9orf72 repeat expansions in South Africans with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 401, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.04.026>

- Notini, A.J., Craig, J.M., y White, S.J. (2008). Copy number variation and mosaicism. *Cytogenetic and Genome Research*, 123(1–4), 270–277. <https://doi.org/10.1159/000184717>
- Nuytemans, K., Bademci, G., Kohli, M.M., Beecham, G.W., Wang, L., Young, J.I., Nahab, F., Martin, E.R., Gilbert, J.R., Benatar, M., Haines, J.L., Scott, W.K., Züchner, S., Pericak-Vance, M.A. y Vance, J.M. (2013). C9ORF72 Intermediate Repeat Copies Are a Significant Risk Factor for Parkinson Disease. *Annals of Human Genetics*, 77(5), 351–363. <https://doi.org/10.1111/ahg.12033>
- Ogaki, K., Li, Y., Atsuta, N., Tomiyama, H., Funayama, M., Watanabe, H., Nakamura, R., Yoshino, H., Yato, S., Tamura, A., Naito, Y., Taniguchi, A., Fujita, K., Izumi, Y., Kaji, R., Hattori, N. y Sobue, G. (2012). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 33(10), 2527.e11-2527.e16. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.011>
- Olney, N.T., Spina, S. y Miller, B.L. (2017). Frontotemporal Dementia. *Neurologic Clinics*, 35(2), 339–374. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.01.008>
- Orsini, M., Oliveira, A.B., Nascimento, O.J., Reis, C.H.M., Leite, M.A.A., de Souza, J.A., Pupe, C., de Souza, O.G., Bastos, V.H., de Freitas, M.R., Teixeira, S., Bruno, C., Davidovich, E. y Smidt, B. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: new perspectives and update. *Neurology International*, 7(2). <https://doi.org/10.4081/ni.2015.5885>
- Oskarsson, B., Gendron, T.F. y Staff, N.P. (2018). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clinic Proceedings*, 93(11), 1617–1628. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.04.007>
- Pamphlett, R., Cheong, P. L., Trent, R. J., y Yu, B. (2013). Can ALS-Associated C9orf72 Repeat Expansions Be Diagnosed on a Blood DNA Test Alone? *PLoS ONE*, 8(7), e70007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070007>
- Pamphlett, R., Cheong, P.L., Trent, R.J. y Yu, B. (2012). Transmission of C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroReport*, 23(9), 556–559. <https://doi.org/10.1097/wnr.0b013e3283544718>
- Pang, W. y Hu, F. (2020). Cellular and physiological functions of C9ORF72 and implications for ALS/FTD. *Journal of Neurochemistry*, 157(3), 334-350. <https://doi.org/10.1111/jnc.15255>
- PhosphoSitePlus® v6.5.9.3. (2019). *Guanine nucleotide exchange C9orf72*. <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=1288158&showAllSites=true>

- Queremel Milani, D. A. y Chauhan, P. R. (2022). Genetics, Mosaicism. StatPearls - NCBI Bookshelf. Recuperado el 18 de abril de 2023, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559193/>
- Raffaele, S., Boccazzi, M. y Fumagalli, M. (2021). Oligodendrocyte Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 10(3), 565. <https://doi.org/10.3390/cells10030565>
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., VanSwieten, J.C., Myllykanhas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzom, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W.,... Traynor, B.J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257-268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>
- Reus, L.M., Jansen, I.E., Mol, M.O., Van Ruissen, F., Van Rooij, J., Van Schoor, N.M., Tesi, N., Reinders, M.J.T., Huisman, M.A., Holstege, H., Visser, P.J., de Boer, S.C.M., Hulsman, M., Ahmad, S., Amin, N., Uitterlinden, A.G., Ikram, A., Van Duijn, C.M., Seelaar, H.,... Van der Lee, S. J. (2021). Genome-wide association study of frontotemporal dementia identifies a C9ORF72 haplotype with a median of 12- G₄C₂ repeats that predisposes to pathological repeat expansions. *Translational Psychiatry*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01577-3>
- Riboldi, G., Zanetta, C., Ranieri, M., Nizzardo, M., Simone, C., Magri, F., Bresolin, N., Comi, G.P. y Corti, S. (2014). Antisense Oligonucleotide Therapy for the Treatment of C9ORF72 ALS/FTD Diseases. *Molecular Neurobiology*, 50(3), 721-732. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8724-7>
- Rizzu, P., Blauwendraat, C., Heetveld, S., Lynes, E.M., Castillo-Lizardo, M., Dhingra, A., Pyz, E., Hobert, M., Synofzik, M., Simón-Sánchez, J., Francescatti, M. y Heutink, P. (2016). C9orf72 is differentially expressed in the central nervous system and myeloid cells and consistently reduced in C9orf72, MAPT and GRN mutation carriers. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 246-256. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0306-7>
- Rodríguez-Leyva, I., Oliva-Barrios, J.E., Cueli-Barcena, S., Carrizales-Rodríguez, J., Chi-Ahumada, E., y Jiménez-Capdeville, M.E. (2019). Demencia frontotemporal: revisión y nuestro punto de vista. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 19(6), 20-31. <https://doi.org/10.24875/rmn.m18000011>
- Rooney, J.P.K, Visser, A.E., D'Ovidio, F., Vermeulen, R., Beghi, E., Chio, A., Veldink, J.H., Logroscino, G., Van den Berg, L.H. y Hardiman, O. (2017). A case-control study of hormonal

exposures as etiologic factors for ALS in women. *Neurology*, 89(12), 1283–1290. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000004390>

- Ross, J. P., Leblond, C. S., Catoire, H., Volkening, K., Strong, M., Zinman, L., Robertson, J., Dion, P. A. y Rouleau, G. A. (2019). Somatic expansion of the C9orf72 hexanucleotide repeat does not occur in ALS spinal cord tissues. *Neurology Genetics*, 5(2), e317. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000317>
- Ryan, M., Zaldívar Vaillant, T., McLaughlin, R.L., Doherty, M.A., Rooney, J., Heverin, M., Gutierrez, J., Lara-Fernández, G.E., Pita Rodríguez, M., Hackembruch, J., Perna, A., Vazquez, M.C., Musio, M., Ketzoian, C.N., Logroscino, G. y Hardiman, O. (2019). Comparison of the clinical and genetic features of amyotrophic lateral sclerosis across Cuban, Uruguayan and Irish clinic-based populations. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(6), 659–665. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-319838>
- Sellier, C., Campanari, M., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., Ruffenach, F., Page, A., Ciura, S., Kabashi, E. y Charlet-Berguerand, N. (2016). Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *The Embo Journal*, 35(12), 1276-1297. <https://doi.org/10.15252/emj.201593350>
- Shamim, U., Ambawat, S., Singh, J., Thomas, A., Pradeep-Chandra-Reddy, C., Suroliya, V., Uppilli, B., Parveen, S., Sharma, P., Chanchal, S., Nashi, S., Preethish-Kumar, V., Vengalil, S., Polavarapu, K., Keerthipriya, M., Mahajan, N.P., Reddy, N., Thomas, P.T., Sadasivan, A.,... Faruq, M. (2020). C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in Indian patients with ALS: a common founder and its geographical predilection. *Neurobiology of Aging*, 88, 156.e1-156.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.12.024>
- Shi, M., Shi, C. y Xu, Y. (2017). Rab GTPases: The Key Players in the Molecular Pathway of Parkinson's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00081>
- Shi, Y., Lin, S., Staats, K.A., Li, Y., Chang, W., Hung, S., Hendricks, E., Linares, G.R., Wang, Y., Son, E.Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M.J., Ge, B.,... Ichida, J.K. (2018). Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nature Medicine*, 24, 313-325. <https://doi.org/10.1038/nm.4490>
- Sivadasan, R., Hornburg, D., Drepper, C., Frank, N., Jablonka, S., Hansel, A., Lojewski, X., Sternecker, J., Hermann, A., Shaw, P.J., Ince, P.G., Mann, M., Meissner, F. y Sendtner, M.

- (2016). C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1610–1618. <https://doi.org/10.1038/nn.4407>
- Sivasathiseelan, H., Marshall, C., Agustus, J., Benhamou, E., Bond, R., van Leeuwen, J., Hardy, C., Rohrer, J. y Warren, J. (2019). Frontotemporal Dementia: A Clinical Review. *Seminars in Neurology*, 39(02), 251–263. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1683379>
 - Smeyers, J., Banchi, E.G. y Latouche, M. (2021). C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 661447. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.661447>
 - Souza, P., Rezende Pinto, W., Oliveira, A, (2015). C9orf72-related disorders: expanding the clinical and genetic spectrum of neurodegenerative diseases. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(3), 246-256. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20140229>
 - Sun, L. y Eriksen, J.L. (2011). Recent Insights into the Involvement of Progranulin in Frontotemporal Dementia. *Current Neuropharmacology*, 9(4), 632–642. <https://doi.org/10.2174/157015911798376361>
 - Tang, B.L. (2016). C9orf72's Interaction with Rab GTPases—Modulation of Membrane Traffic and Autophagy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 228. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00228>
 - Tang, D., Sheng, J., Xu, L., Yan, C. y Qi, S. (2020b). The C9orf72-SMCR8-WDR41 complex is a GAP for small GTPases. *Autophagy*, 16(8), 1542-1543. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1779473>
 - Tang, D., Sheng, J., Xu, L., Zhan, X., Liu, J., Jiang, H., Shu, X., Liu, X., Zhang, T., Jiang, L., Zhou, C., Li, W., Cheng, W., Li, Z., Wang, K., Lu, K., Yan, C. y Qi, S. (2020a) Cryo-EM structure of C9ORF72–SMCR8–WDR41 reveals the role as a GAP for Rab8a and Rab11a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(18), 9876-9883. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002110117>
 - Telenius, H., Kremer, B., Goldberg, Y.P., Theilmann, J., Andrew, S.E., Zeisler, J., Adam, S., Greenberg, C., Ives, E.J., Clarke, L.A. y Hayden, M.R. (1994). Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nature Genetics*, 6(4), 409–414. <https://doi.org/10.1038/ng0494-409>
 - The Human Protein Atlas. (2021). *C9orf72 tissue atlas*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147894-C9orf72/tissue>
 - The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledge base in 2021. (2021). *UniProtKB - Q96LT7 (CI072_HUMAN)*. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q96LT7>

- The World Medical Association. (2022). Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Recuperado el 25 de abril de 2023, de: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
- Theuns, J., Verstraeten, A., Sleegers, K., Wauters, E., Gijssels, I., Smolders, S., Crosiers, D., Corsmit, E., Elinck, E., Sharma, M., Kruger, R., Lesage, S., Brice, A., Chung, S.J., Kim, M.J., Kim, Y.J., Ross, O.A., Wszolek, Z.K., Roggeva, E.,... Van Broeckhoven, C. (2014). Global investigation and meta-analysis of the *C9orf72* (G4C2)_n repeat in Parkinson disease. *Neurology*, 83(21), 1906–1913. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001012>
- Ticozzi, N. (2017). Novel risk genes and their clinical impact in Amyotrophic Lateral Sclerosis (1a Ed.). Colophon. ISBN: 979-12-200-1735-0
- Todd, T.W., y Petrucelli, L. (2016). Insights into the pathogenic mechanisms of Chromosome 9 open reading frame 72 (*C9orf72*) repeat expansions. *Journal of Neurochemistry*, 138(S1), 145–162. <https://doi.org/10.1111/jnc.13623>
- Trageser, K.J., Smith, C., Herman, F.J., Ono, K. y Pasinetti, G.M. (2019). Mechanisms of Immune Activation by *c9orf72*-Expansions in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1298. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01298>
- Turner, M.R., Al-Chalabi, A., Chio, A., Hardiman, O., Kiernan, M.C., Rohrer, J.D., Rowe, J., Seeley, W. y Talbot, K. (2017). Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 88(12), 1042–1044. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-315995>
- Universidad de Delaware y Centro Médico de la Universidad Georgetown: iPTMnet. (2021). *iPTMnet Report for Q96LT7 (C9orf72)*. <https://research.bioinformatics.udel.edu/iptmnet/entry/Q96LT7/expand>
- University of California Santa Cruz [UCSC]. (2019). *Gene Expression in 54 tissues from GTEx RNA-seq of 17382 samples, 948 donors (V8, Aug 2019) (C9orf72)*. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=981967363_YZ1L4FORH22EHttltReKPjXUS1Pu&c=chr9&l=0&r=138394717&o=27546544&t=27573866&q=gtxGeneV8&i=C9orf72
- Van Blitterswijk, M., DeJesus-Hernandez, M. y Rademakers, R. (2012). How do C9ORF72 repeat expansions cause amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Current Opinion in Neurology*, 25(6), 689–700. <https://doi.org/10.1097/wco.0b013e32835a3efb>

- Van Blitterswijk, M., DeJesus-Hernandez, M., Niemantsverdriet, E., Murray, M. E., Heckman, M. G., Diehl, N. N., Brown, P. H., Baker, M. C., Finch, N. A., Bauer, P. O., Serrano, G., Beach, T. G., Josephs, K. A., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., Boylan, K. B., Petrucelli, L.,... Rademakers, R. (2013). Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9ORF72 repeat expansions (Xpansize-72): a cross-sectional cohort study. *The Lancet Neurology*, 12(10), 978–988. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(13\)70210-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70210-2)
- Van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H. y Van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 390(10107), 2084–2098. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31287-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4)
- Vega, R. (2020). *Mejoran calidad de vida a pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica*. Tecnológico de Monterrey. <https://tec.mx/es/noticias/nacional/salud/mejoran-calidad-de-vida-pacientes-con-esclerosis-lateral-amiotrofica>
- Wang, S., Hu, C., Wu, F. y He, S. (2017). Rab25 GTPase: Functional roles in cancer. *Oncotarget*, 8(38), 64591-64599. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19571>
- Webster, C.P., Smith, E.F., Grierson, A.J. y De Vos, K.J. (2016). C9orf72 plays a central role in Rab GTPase-dependent regulation of autophagy. *Small GTPases*, 9(5), 399-408. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1240495>
- Wen, X., Westergard, T., Pasinelli, P. y Trotti, D. (2017). Pathogenic determinants and mechanisms of ALS/FTD linked to hexanucleotide repeat expansions in the *C9orf72* gene. *Neuroscience letters*, 636, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.007>
- Wijesekera, L. C. y Leigh, P.N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-3>
- Xiao, S., MacNair, L., McGoldrick, P., McKeever, P., McLean, J., Zhang, M., Keith, Zinman, L., Rogaeva, K. y Robertson, J. (2015). Isoform-Specific Antibodies Reveal Distinct Subcellular Localizations of C9orf72 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology*, 78(4), 568-583. <https://doi.org/10.1002/ana.24469>
- Xiao, S., MacNair, L., McLean, J., McGoldrick, P., McKeever, P., Soleimani, S., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, K. y Robertson, J. (2016). C9orf72 isoforms in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Brain Research*, 1647, 43-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.062>
- Xu, L., Liu, T., Liu, L., Yao, X., Chen, L., Fan, D., Zhan, S. y Wang, S. (2020). Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-

analysis. *Journal of Neurology*, 267(4), 944–953. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09652-y>

- Xu, X., Su, Y., Zou, Z., Zhou, Y. y Yan, J. (2021). Correlation between C9ORF72 mutation and neurodegenerative diseases: A comprehensive review of the literature. *International Journal of Medical Sciences*, 18(2), 378–386. <https://doi.org/10.7150/ijms.53550>
- Yang, Q., Jiao, B. y Shen, L. (2020). The Development of C9orf72-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Disorders. *Frontiers in Genetics*, 11, 562758. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.562758>
- Young, J.J., Lavakumar, M., Tampi, D., Balachandran, S. y Tampi, R. R. (2017). Frontotemporal dementia: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 8(1), 33–48. <https://doi.org/10.1177/2045125317739818>
- Zanella, I., Zacchi, E., Piva, S., Filosto, M., Beligni, G., Alaverdian, D., Amitrano, S., Fava, F., Baldassarri, M., Frullanti, E., Meloni, I., Renieri, A., Castelli, F. y Quiros-Roldan, E. (2021). C9orf72 Intermediate Repeats Confer Genetic Risk for Severe COVID-19 Pneumonia Independently of Age. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6991. <https://doi.org/10.3390/ijms22136991>
- Zauza-Carrasco, M., Rosenfeld-Mann, F. y Estrada-Juárez, H. (2015). Análisis de las variaciones en el número de repeticiones de 5 marcadores ancestrales en donadores recurrentes en México. *Perinatología Y Reproducción Humana*. <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2015.12.007>
- Zeigerer, A., Gilleron, J., Bogorad, R.L., Marsico, G., Nonaka, H., Seifert, S., Epstein-Barash, H., Kuchimanchi, S., Peng, C.G., Ruda, V.M., Del Conte-Zerial, P. Hengstler, J.G., Kalaidzidis, Y., Koteliansky, V. y Zerial, M. (2012). Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, 485(7399), 465-470. <https://doi.org/10.1038/nature11133>
- Zhang, C., Shang, G., Gui, X., Zhang, X., Bai, X.C., y Chen, Z.J. (2019). Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. *Nature*, 567(7748), 394–398. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1000-2>
- Zhou, F., Zou, S., Chen, Y., Lipatova, Z., Sun, D., Zhu, X., Li, R., Wu, Z., You, W., Cong, X., Zhou, Y., Xie, Z., Gyurkovska, V., Liu, Y., Li, Q., Li, W., Cheng, J. Liang, Y. y Segev, N. (2017). A Rab5 GTPase module is important for autophagosome closure. *PLOS Genetics*, 13(9), e1007020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007020>
- Zhou, Q., Mareljic, N., Michaelsen, M., Parhizkar, S., Heindl, S., Nuscher, B., Farny, D., Czuppa, M., Schludi, C., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Feederle, R., Roth, S., Haass, C.,

Arzberger, T., Liesz, A. y Edbauer, D. (2019). Active poly-GA vaccination prevents microglia activation and motor deficits in a C9orf72 mouse model. *EMBO Molecular Medicine*, 12(2), e10919. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910919>

- Zhou, W., Li, Y., Pan, X., Gao, Y., Li, B., Qiu, Z., Liang, L., Zhou, H Yue, J. (2013). Toll-like receptor 9 interaction with CpG ODN – An *in silico* analysis approach. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 10, 18. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-10-18>. y

XIII. APÉNDICE

A. CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ELA



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

DM-CI-CECMELA-1-2015

CONSENTIMIENTO INFORMADO: "CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA"

NOMBRE DEL PACIENTE _____	FECHA _____	HORA _____
REGISTRO _____	FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____	
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL _____		

Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

- * He sido invitado/a participar en el proyecto de investigación: "CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO CLÍNICO Y MOLECULAR DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)"
- * He sido informado/a que tengo o mi familiar tiene diagnóstico clínico de ELA-
- * He sido informado/a que en el departamento de Genética de este Instituto se está realizando una investigación para saber si las familias con o sin antecedentes hereditarios, tienen mutaciones (alteraciones) en genes que causan ELA.
- * He sido informado/a que los genes a estudiar en el presente proyecto son: el hexanucleótido repetido *C9ORF72*, *SOD1*, *FUS* y *TARDBP*.
- * He sido informado/a que si acepto participar en este estudio se me tomará a mí o a mi familiar afectado una muestra de sangre periférica de 10 ml., de la cual se extraerá mi DNA (material hereditario) en el que se estudiarán los genes mencionados.
- * He sido informado/a que mi participación o la de mi familiar en este estudio es VOLUNTARIA y si no acepto/a participar, esto no afectará mi/su atención en el Instituto.
- * He sido informado/a que mi/su participación en el estudio no representa ningún costo para mí/el, ni recibiré remuneración económica alguna.



CONSENTIMIENTO INFORMADO: "CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA"

- * He sido informado/a que si en mi familia se encuentra alguna mutación, nos contactarán para informarnos y explicarnos los resultados.

- * He sido informado/a que puedo o mi familiar puede abandonar el estudio en el momento que lo desee.

- * Autorizo que mi DNA se use para esta investigación y otras en las que se están analizando genes de la población mexicana: SI _____ NO _____

- * He sido informado/a que si me surge alguna duda sobre este estudio puedo comunicarme con la Dra. Petra Yescas Gómez. al teléfono 56 06 38 22 Ext. 2002 ó 3041 o con la Dra. Catherine Boll o el Dr Steven Vargas. También me puedo dirigir con el Dr. Ricardo Colín Piana, presidente del Comité de Bioética de nuestro Instituto a la extensión 5027.

Dirección:

Teléfono:

Correo electrónico:

NOMBRE y FIRMA DEL MÉDICO

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

B. FENOTIPOS ASOCIADOS CON HRE EN GRUPO DE PACIENTES

PACIENTE ELA CON EXPANDIDO	GÉNERO	CAUSA									
		DFT/ AHF DFT	ELA familiar	ELA de inicio juvenil	ELA de evolución lenta	ELA bulbar	ELA braquial	ELA crural	ELA Vulpian- Bernhardt	Parkinsonismo	Sin registro de algún fenotipo
I	F				X						
II	M	X								X	
III	F										X
IV	F										X
V	F			X							
VI	M										X
VII	M										X
VIII	M				X						
IX	F										X
X	M	X						X			
XI	F			X				X			
XII	F		X			X					
XIII	F										X
XIV	M						X				
XV	M										X
XVI	F										X
XVII	M		X			X					
XVIII	M	X					X				
XIX	M			X	X				X		
XX	M						X				