



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNETICAS EN
SOD1 Y *TARDBP* EN PACIENTES CON
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**Francisco Javier Bravo Espinosa de los
Monteros**



MÉXICO, D.F. 26 de octubre AÑO 2015



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.

Índice de contenido

Índice de contenido	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas.....	IV
Abreviaturas	V
Resumen	VIII
1 Esclerosis Lateral Amiotrófica	1
1.1 Antecedentes históricos	1
1.2 Definición de ELA.....	1
1.3 Epidemiología.....	1
1.4 Características clínicas.....	3
1.5 Diagnóstico.....	4
1.5.1 <i>Electromiografía (EMG):</i>	5
1.5.2 <i>Estudios de neuroimagen</i>	5
1.5.3 <i>Patología: biopsia muscular</i>	5
1.5.4 <i>Criterios de "El Escorial"</i>	5
1.5.5 <i>Diagnóstico Diferencial</i>	7
1.5.6 <i>Escala de valoración funcional de ELA revisada (ALSFRS-R)</i>	8
1.5.7 <i>Tratamiento</i>	8
1.6 Fisiopatología	8
1.6.1 <i>Procesos fisiopatológicos</i>	9
1.7 Genética de la ELA	12
1.7.1 <i>SOD1 (ELA 1)</i>	14
1.7.2 <i>TARDBP (ELA 10)</i>	15
1.8 Etiopatogenia Teorías.....	19
1.8.1 <i>Superóxido dismutasa 1 de Cu²⁺/Zn²⁺ (SOD1)</i>	19
1.8.2 <i>Proteína Tar de unión a DNA (TDP-43)</i>	24
2 Justificación	27
3 Hipótesis	28
4 Objetivos	28

4.1	Objetivos generales:	28
4.2	Objetivos particulares:	28
5	Metodología	29
5.1	Sujetos.....	29
5.2	Criterios de selección del estudio.....	29
	5.2.1 Criterios de inclusión	29
	5.2.2 Criterios de exclusión	29
	5.2.3 Criterios de eliminación	30
5.3	Extracción de DNA Genómico.....	30
5.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
	5.4.1 SOD1	32
	5.4.2 TARDBP	32
5.5	Electroforesis.....	33
5.6	Reacción de Secuenciación	34
6	Resultados.....	35
6.1	Análisis de la muestra.....	35
6.2	Análisis de los productos de PCR.....	37
6.3	Mutaciones encontradas en el gen SOD1	39
	6.3.1 Familia 1	40
	6.3.2 Familia 3	43
	6.3.3 Familia 4	45
	6.3.4 Familia 2 y casos esporádicos	47
7	Análisis de resultados y discusión	48
7.1	Mutación p.A90T	48
7.2	Mutación p.H47R.....	49
7.3	Mutación p.C7S	50
7.4	Discusión.....	50
8	Conclusiones	52
9	Referencias.....	53

Índice de figuras

<i>Figura 1: Clasificación de la ELA.</i>	2
<i>Figura 2: Resumen de los criterios diagnósticos de "El Escorial"</i>	7
<i>Figura 3: Vías fisiopatológicas en la ELA</i>	9
<i>Figura 4: Genes asociados a ELAF</i>	14
<i>Figura 5: Estructura de la proteína TDP-43</i>	17
<i>Figura 6: Espectro clínico ELA - DFT</i>	18
<i>Figura 7: Reacción de la Superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1)</i>	20
<i>Figura 8: Estructura del dímero de la superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1)</i>	21
<i>Figura 9: Esquema del posible mecanismo de agregación de la proteína SOD</i>	23
<i>Figura 10: Esquema del posible mecanismo de agregación de la proteína TDP-43</i>	26
<i>Figura 11: Porcentaje de casos familiares y esporádicos.</i>	36
<i>Figura 12: Gel de agarosa con los amplicones de los 5 exones del gen SOD1</i>	38
<i>Figura 13: Gel de agarosa con los amplicones de los 5 exones codificantes del gen TARDBP.</i>	39
<i>Figura 14: Electroferogramas parcial de muestra control y de paciente con mutación en el exón 4 de SOD1.</i>	41
<i>Figura 15: Árbol genealógico de la familia 1</i>	42
<i>Figura 16: Electroferogramas parcial de una secuencia control (C) y mutada (P) del exón 2 de SOD1.</i>	43
<i>Figura 17: Árbol genealógico de la familia 3</i>	44
<i>Figura 18: Electroferogramas parcial parciales de secuencias control y mutada del exón 1 de SOD1.</i>	45
<i>Figura 19: Árbol genealógico de la Familia 4</i>	46
<i>Figura 20: Árbol genealógico de la Familia 2</i>	47

Índice de tablas

<i>Tabla 1: Características clínicas del daño neuronal.....</i>	<i>3</i>
<i>Tabla 2: Diagnóstico diferencial de ELA</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 3: Genes asociados a la ELA.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 4: Superóxido dismutasa</i>	<i>15</i>
<i>Tabla 5: Mezcla de reacción para la amplificación de los exones del gen SOD1.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 6: Perfil térmico general de la técnica de PCR para el gen SOD1.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 7: Mezcla de reacción para la amplificación de cada uno de los exones del gen TARDBP.</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 8: Perfil térmico general para la técnica de PCR del gen TARDBP.</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 9: Reacción de secuenciación</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 10: Programa de la reacción de secuenciación</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 11: Características de la población estudiada.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 12: Variantes identificadas en pacientes con ELA familiar</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 13: Características clínicas Familia 1</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 14: Características clínicas de la Familia 3.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 15: Características clínicas Familia 4</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 16: Características clínicas Familia 2</i>	<i>47</i>

Abreviaturas

A

Adenina

AD

Autosómico dominante

ADC

Ácido citrato dextrosa

ADN

Ácido desoxirribonucleico

Ala

Alanina

ALSFRS-R

AR

Autosómico recesivo

Arg

Arginina

BLGR

Amortiguador de lisis de glóbulos rojos

C

Citosina

Cys

Cisteína

DFT

Demencia fronto temporal

EIM

Espacio intermembranal de la mitocondria

ELA

Esclerosis lateral amiotrófica

ELAbi

ELA con déficit de comportamiento

ELAc

ELA con déficit cognitivo

ELAE

Esclerosis lateral amiotrófica esporádica

ELAF
Esclerosis lateral amiotrófica
familiar

ELAj
Esclerosis lateral amiotrófica
juvenil

EMG
Electro miografía

G
Guanina

GFAP
Proteína de filamentos gliales
intermedios

His
Histidina

HIV-1
Virus de inmunodeficiencia
humana tipo 1

HnRNP
Proteínas heterogéneas
nucleares y ribonucleares

LTR
Repetidos largos en tándem

mRNAs
Micro RNA

NM
Neurona motora

NMI
Neurona motora inferior

NMS
Neurona motor superior

PCR
Reacción en cadena de la
polimerasa

PIA
Proteínas inhibidoras de la
apoptosis

RMN
Resonancia magnética nuclear

RNA
Ácido ribonucleico

ROS
Especies reactivas de oxígeno

RRM's
Motivos de reconocimiento de
RNA

Ser
Serina

SNC
Sistema nervioso central

SOD1
Superóxido dismutasa 1

T
Timina

TAC
Tomografía axial computarizada

TARDBP
Proteína TAR de unión a RNA

Thr
Treonina

Resumen

“Identificación de variantes génicas en *SOD1* y *TARDBP* en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica”

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, caracterizada por la pérdida de las neuronas motoras superiores e inferiores que sigue un curso progresivo. La enfermedad es fatal y aproximadamente el 50% de los pacientes mueren de 3 a 5 años posterior a la aparición de los síntomas. La incidencia es de 2.4 casos por cada 100 mil habitantes por año y se han logrado identificar genes causantes de formas hereditarias de ELA, que corresponden al 10% de los casos los cuales siguen un patrón autosómico dominante, mientras que el 90% restante de los casos son esporádicos. Se ha identificado la participación de 29 loci, sin embargo dos de los genes principalmente involucrados son *SOD1* y *TARDBP*. El gen *SOD1* codifica para la proteína superóxido dismutasa de Cu/Zn, su principal función es la eliminación de radicales superóxido y se han descrito 248 mutaciones que la han relacionado como la principal causa de las formas familiares de ELA. El gen *TARDBP* codifica para la proteína TDP-43, una ribonucleoproteína nuclear y principal componente de inclusiones positivas a ubiquitina presentes en más del 95% de los pacientes con ELA. Las mutaciones en este gen se han observado tanto en formas familiares como esporádicos. Se considera a este gen de gran importancia, y se postula como un punto convergente en la patogénesis de la enfermedad independientemente del factor inicial que la ocasiona.

La ELA no presenta predilección étnica y su prevalencia varía alrededor del mundo, por lo que el objetivo de este trabajo es identificar mutaciones o polimorfismos en el gen *SOD1* y *TARDBP* en pacientes mexicanos con ELA.

Se analizaron 40 pacientes diagnosticados con ELA definida, mediante los criterios del "El Escorial" y se determinó el comportamiento clínico de los casos aplicando la escala funcional para ELA. Se identificaron 5 casos familiares pertenecientes a 4 familias y 34 casos esporádicos.

Solo en 4 casos familiares se identificaron las mutaciones p.H47R, p.A90T y p.C7S en el gen **SOD1** y en ninguno de los casos estudiados (esporádicos y familiares) se presentó mutación en **TARDBP**. Las mutaciones identificadas afectan la función y estructura de la proteína determinando de este modo el fenotipo de la enfermedad de acuerdo a lo descrito en otras poblaciones. La identificación de estas variantes genéticas en pacientes mexicanos contribuye a entender mejor los mecanismos que la ocasionan, su distribución y frecuencia. Y dada la dificultad del diagnóstico clínico los resultados de este trabajo permitirán confirmar el diagnóstico clínico, lo que ayudara a terminar con la incertidumbre en el paciente y permitirá establecer en sus familiares los riesgos, mediante el asesoramiento genético oportuno.

1 Esclerosis Lateral Amiotrófica

1.1 Antecedentes históricos

La primera descripción clínica y patológica de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) fue realizada durante el periodo de 1869 - 1874 por el neurólogo francés Jean M. Charcot considerado como el padre de la Neurología. En Estados Unidos se denomina como la enfermedad de Lou Gehrig (en honor a un famoso jugador de béisbol afectado por ELA en 1941)¹

1.2 Definición de ELA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la pérdida de neuronas motoras inferiores (NMI) y las neuronas motoras superiores (NMS) de forma progresiva las cuales se encuentran en la corteza motora primaria, el tallo cerebral y la médula espinal². **La palabra "amiotrofia" se refiere a la debilidad y disminución de la masa muscular en músculos esqueléticos causada por la denervación y degeneración de las neuronas del asta anterior, mientras que "esclerosis lateral" se refiere a la degeneración neuronal del asta anterior y del tracto corticoespinal lateral, además de la presencia de gliosis²**

1.3 Epidemiología

La incidencia de ELA en la población mundial es de 1 - 3 por cada 100,000 personas al año³, mientras que la incidencia por género es mayor en los hombres con 1.5 - 3.0 por cada 100,000 personas al año, mientras que en el caso de las mujeres se presenta con una incidencia de 1 - 2.4 por cada 100,000 personas al año. La prevalencia es de 6 por cada 100,000 personas al año de cualquier edad.^{2,3}

La ELA puede clasificarse en casos esporádicos (ELAE) cuando en la familia no existen antecedentes de la enfermedad y en casos familiares (ELAF) cuando dos o más familiares están afectados³. La ELAF se presenta en un

10% de los casos^{1, 3, 4} mientras que la ELAE en el 90% restante⁴, de igual forma se ha observado que existe una tercer forma de clasificación denominada ELA de tipo Western Pacific asociada a un espectro clínico de ELA-Parkinson la cual se ha descrito específicamente en tres poblaciones pertenecientes a Japón, Guam y Nueva Guinea y cuyos datos epidemiológicos son independientes con respecto a la población mundial y a otros tipos de ELA.^{5, 6, 7}

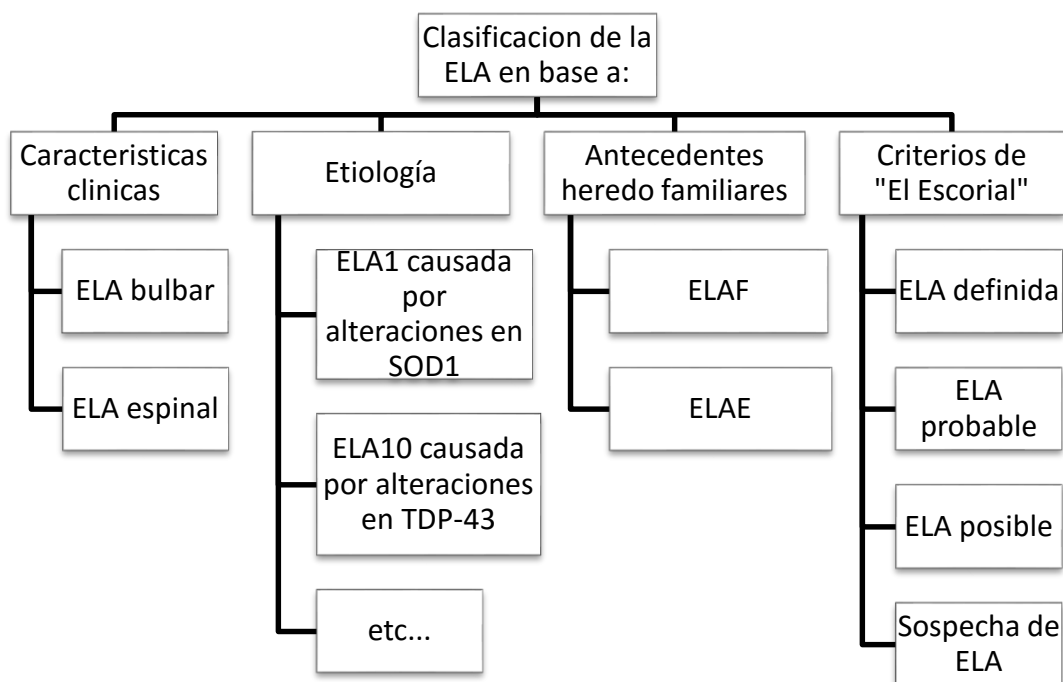


Figura 1: Clasificación de la ELA.

La ELA puede clasificarse de diversas formas como lo son: por sus características clínicas, por su etiología asociada a un gen específico, por sus antecedentes heredo familiares o por los criterios definidos por "El Escorial" en donde se toman en cuenta las evidencias obtenidas en los exámenes clínicos y la evaluación neurológica.

La edad de inicio de la ELAE varía de entre los 55 a 65 años y de 47 a 52 para la ELAF^{4, 5}. En el 5% de los casos totales los pacientes inician antes de los 25 años por lo que se consideran como ELA juvenil (ELAj)^{1, 5}.

La media de supervivencia es de 3 años a partir de la aparición de los síntomas, pero esta puede variar desde 2 hasta 5 años; el 20% de los pacientes logran un periodo de supervivencia de 5 - 10 años, mientras que un 10% tendrá una supervivencia de más de 10 años⁶; la muerte típicamente es debida a la parálisis de los músculos de la respiración^{7, 8,9}.

1.4 Características clínicas

La identificación de fenotipos específicos en la ELA tiene implicaciones importantes para los pacientes con respecto al pronóstico, la supervivencia, así como para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades de la neurona motora.^{2, 4}

La ELA es reconocida como una enfermedad neurodegenerativa, en la cual la neurona motora se ve particular pero no exclusivamente afectada, dando lugar a síntomas clínicamente reconocibles²; de acuerdo a la localización neuroanatómica podemos clasificar los síntomas como de neurona motora superior (NMS), de neurona motora inferior (NMI) (Tabla 1), bulbares y no motores^{1,2,4}

Tabla 1: Características clínicas del daño neuronal

Neurona motora superior	Neurona motora inferior
Debilidad moderada	Debilidad
Ralentización de los movimientos	Hiporeflexia
Espasticidad	Atrofia muscular
Pérdida de la destreza	Fasciculación
Hiperreflexia	Calambres musculares
Afectación pseudobulbar	Hipotonía

De igual forma en algunos de los casos se puede ver afectado el sistema no motor produciendo cuadros clínicos con: disfunción ejecutiva (pérdida de neuronas de la región frontotemporal), parkinsonismo (lesión en ganglios basales) y con menor frecuencia pérdida sensorial (lesión en ganglios dorsales).^{1, 2, 4}

Las variantes clínicas más comunes de ELA incluyen:

- ELA de inicio en las extremidades⁴, en el cual los pacientes presentan síntomas como debilidad muscular focal que puede iniciar de forma distal o proximal en las extremidades superiores o las inferiores y se caracteriza por ser asimétrica; se acompaña de hipotrofia regional, fasciculaciones (contracciones musculares involuntarias)¹ y gradualmente desarrollan espasticidad en las extremidades hipotróficas, un signo poco común es la alteración sensitiva.
- ELA de inicio bulbar; en este cuadro el paciente presenta disfagia y disartria, con afección posterior de las extremidades⁴, los cuadros de inicio bulbar se consideran que tiene una menor incidencia entre los pacientes.²

En aproximadamente el 70% de los casos los pacientes inician con síntomas en las extremidades, la enfermedad de inicio bulbar se presenta en alrededor del 25% de los casos, y cuadros con afectación respiratoria inicial en aproximadamente el 5%, extendiéndose posteriormente a otras regiones.⁴

Sin embargo, se han identificado variantes clínicas con características, presentación, progresión y pronóstico diferentes a los cuadros más comunes.²

1.5 Diagnóstico

Para la realización del diagnóstico de ELA se debe de tomar en cuenta la presencia de los síntomas de afección en las NMS y NMI clásicos como son debilidad muscular, hipotrofia, fasciculaciones, disfagia, disartria; las pruebas neurofisiológicas de patología o de imagen ayuden a descartar otros diagnósticos que suelen manifestar similitudes con la ELA así como el diagnóstico molecular confirmatorio de la enfermedad, estos datos

clínicos ayudaran a definir si el paciente cumple con los criterios de EL Escorial.¹¹

1.5.1 Electromiografía (EMG):

La electromiografía proporciona la evidencia de la disfunción de la neurona motora a través de la detección de la diferencia en el potencial eléctrico que activa a las células musculares, los datos de muerte neuronal compatible con el diagnóstico de ELA deben ser identificados en al menos dos de las cuatro regiones del SNC: bulbar, cervical, torácica y lumbosacra.^{1, 4}

1.5.2 Estudios de neuroimagen

La neuroimagen (RMN o TAC) se emplea para poder llevar a cabo la exclusión de lesiones estructurales que generan un cuadro clínico similar a la ELA mediante la producción de signos de NMS y NMI; estos criterios establecen que los estudios no son requeridos cuando el paciente presenta signos bulbares o aparición de datos pseudobulbares, ya que este tipo de lesiones no generan síntomas similares a la ELA clínicamente definida.^{1, 4}

1.5.3 Patología: biopsia muscular

La biopsia de músculo esquelético o de otros tejidos para el diagnóstico no es necesaria a menos que se requiera para descartar un síndrome que mimetice con la ELA como la enfermedad de Kennedy o las lesiones en la corteza motora, o para demostrar la afección de la NMI cuando los hallazgos clínicos o electrofisiológicos no lo apoyan^{1,4}.

1.5.4 Criterios de "El Escorial"

A. La presencia de:

1. Evidencia de degeneración del tipo de neurona motora inferior, por examen clínico, electrofisiológico o neuropatológico.

2. Evidencia de degeneración de neurona motora superior por examen clínico.
3. Progresión de los síntomas o signos dentro de una región o de otras regiones determinados por medio de la historia clínica o exploración física.

B. La ausencia de:

1. Evidencia electrofisiológica o patológica de otra enfermedad que pueda explicar los signos de degeneración de neurona motora superior o inferior
2. Evidencia de neuroimagen de otro proceso o enfermedad que pueda explicar los signos clínicos y electrofisiológicos explicados.

Tomando en cuenta a los hallazgos clínicos se puede clasificar la ELA de acuerdo a la certeza del diagnóstico en (Figura 2):

1. ELA Definida. Evidencia clínica de signos de NMS y de NMI en 3 regiones de las anteriormente mencionadas.
2. ELA probable. Evidencia clínica de signos de NMS y de NMI en al menos 2 regiones, con los signos de NMS predominando sobre los de NMI^{1, 2,4}.
3. ELA posible. Evidencia clínica de signos de NMS y de NMI en una región; o los signos de NMS están solamente presentes en una región, y los signos de NMI están definidos por criterios de EMG en al menos 2 extremidades; con la apropiada aplicación de protocolos de neuroimagen y laboratorio para excluir otras causas^{2, 4}.

4. Sospecha de ELA. Signos puros de NMI en 2 o 3 regiones (p. Ej., atrofia muscular progresiva y otros síndromes motores) ^{2,4}.

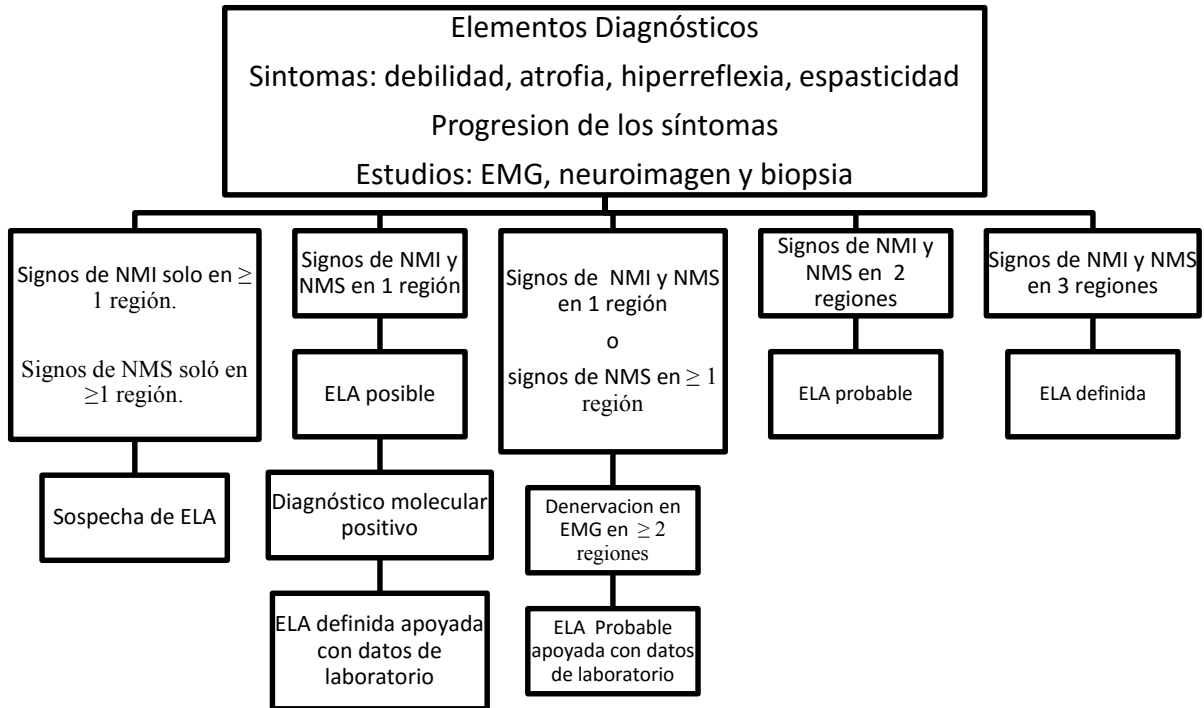


Figura 2: Resumen de los criterios diagnósticos de "El Escorial"

La evidencia de daño en las NMS y NMI se identificarán dentro de cuatro regiones del SNC que son: bulbar, cervical, torácica y lumbosacra.

1.5.5 Diagnóstico Diferencial

Durante el proceso para diagnosticar la ELA se deben tomar en cuenta otros padecimientos donde se puedan observar lesiones en la neurona motora o lesiones en la médula espinal que darán origen a cuadros clínicos similares al de los pacientes con ELA^{1, 2,4}.

Los principales diagnósticos diferenciales a considerar son: lesiones cerebrales en la corteza motora, lesiones en la base del cráneo, lesiones en la médula, afección de la unión neuromuscular, miopatías y otras enfermedades de la neurona motora, como podría ser una deficiencia enzimática^{1,4} (Tabla 2).

Tabla 2: Diagnóstico diferencial de ELA

Diagnóstico diferencial	Rasgos característicos
Lesiones cerebrales	Lesiones frontales, cervicales o lumbosacras*
Lesiones en la base del cráneo	Síntomas bulbares asimétricos
Mielopatía cervical espondilótica	Debilidad progresiva en los miembros, signos de NMS y NMI.
Otras mielopatías cervicales	Siringomielia asociada generalmente con signos de NMI y pérdida sensorial disociada
Lesiones del cono medular y radiculopatía lumbosacra	Síndrome progresivo con datos de NMI y NMS mezclados.
Miositis por cuerpos de inclusión	Síntomas bulbares y debilidad progresiva
Neuropatía motora multifocal	Síndrome de NMI puro con inicio focal asimétrico
Enfermedad de Kennedy	Síntomas bulbares lentamente progresivos y debilidad en miembros con solo hombres sintomáticos.

1.5.6 Escala de valoración funcional de ELA revisada (ALSFRS-R)

La ALSFRS-R es una herramienta diagnóstica que ayuda a determinar los factores predictivos de supervivencia en la ELA, en ella se estudian diferentes parámetros los cuales se califican en una escala de 0 a 48 puntos para evaluar el grado de discapacidad funcional del paciente, el valor de esta escala puede correlacionarse con el tiempo de supervivencia²⁷.

1.5.7 Tratamiento

En la actualidad no se cuenta con un tratamiento específico para la ELA por lo que se considera como una enfermedad incurable, sin embargo los síntomas que surgen durante el curso de la enfermedad son tratables mediante una atención multidisciplinaria y cuidados paliativos^{1, 18, 28}.

1.6 Fisiopatología

La fisiopatología aún es poco clara ya que los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la degeneración de la neurona en la ELA es complejo e incluye múltiples vías de lesión celular¹⁷ como se muestra en la Figura 3,

sin embargo se han logrado identificar tanto factores genéticos y ambientales, como vías metabólicas consideradas clave durante el desarrollo de la enfermedad¹⁷, estas vías serán explicadas brevemente a continuación.

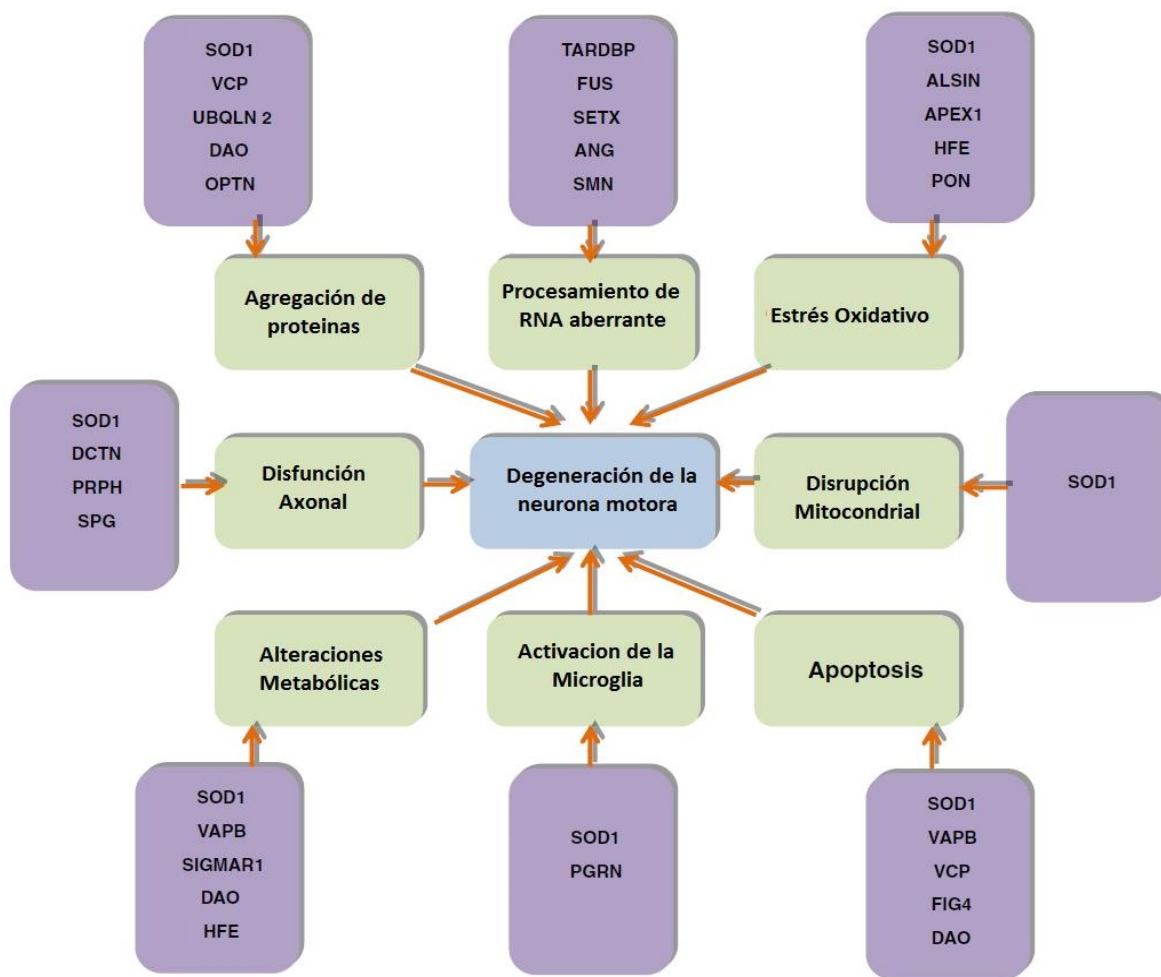


Figura 3: Vías fisiopatológicas en la ELA

La ELA es causada por la interacción de diversas vías moleculares que afectan a las neuronas motoras y su interacción con las células neuronales vecinas como la microglía y los astrocitos: En los cuadros de color púrpura se pueden observar las proteínas relacionadas a cada una de las vías patológicas en la ELA.³

1.6.1 Procesos fisiopatológicos

1.6.1.1 Excitotoxicidad

Es la toxicidad neuronal inducida por una estimulación excesiva de los receptores de glutamato por un mecanismo que alteran la homeostasis del

calcio intracelular y la producción excesiva de radicales libres mediados por la presencia de SOD1 mutante.

1.6.1.2 Estrés oxidativo

Una de las principales causas del deterioro en la función neuronal en las enfermedades neurodegenerativas es explicado por el estrés oxidativo ocasionado por el daño acumulativo de radicales libres, la ELA no es la excepción ya que existe una similitud clínica y patológica con estas y otras enfermedades de la neurona motora en las que se han identificado como principal causa una alteración en la función de la proteína superóxido dismutasa de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (SOD1)^{17, 18,19}.

1.6.1.3 Disfunción mitocondrial

En estudios anteriores se han reportado anomalías en la morfología y la bioquímica mitocondrial de pacientes con ELAE, en estos casos las mitocondrias han mostrado niveles elevados de calcio debido a defectos en su almacenamiento así como una disminución en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria I y IV, teniendo como consecuencia un defecto en el metabolismo energético. También se han reportado mutaciones en el ADN mitocondrial de pacientes con ELAE^{17, 18} que dan lugar a una disfunción de la mitocondria e inducción de la apoptosis mitocondrial^{19, 20}.

1.6.1.4 Agregación de neurofilamentos

La acumulación de neurofilamentos es un hallazgo frecuente en diferentes enfermedades neurodegenerativas incluyendo la ELA^{1, 17}; la periferina o GFAP (proteína de filamentos gliales intermedios) se ha reportado con una alta frecuencia dentro de las inclusiones axonales de las neuronas motoras en pacientes con ELA¹⁸.

1.6.1.5 Agregación proteica

Las inclusiones intracitoplasmáticas de proteínas mal plegadas debido a mutaciones en sus genes codificantes han sido un signo distintivo de la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas¹. Sin embargo, no se ha logrado determinar la importancia de este tipo de agregados y su papel dentro de la patogénesis de la enfermedad ya que pueden presentar subproductos inocuos derivados del metabolismo de la proteína y que durante el curso de la enfermedad no pierden su función, sino bien una ganancia de función toxica debido a que su degradación vía el proteosoma no es completa lo que permite el secuestro de proteínas de importancia en la célula, estas alteraciones están directamente relacionadas con la disfunción y muerte celular¹⁷.

1.6.1.6 Inflamación y contribución de las células no neurales

Aunque la ELA no se puede considerar una enfermedad autoinmune recientemente ha aumentado la evidencia de la participación de procesos inflamatorios sistémicos y de células no neurales. La activación de las células de la microglía se asocia con su transformación en células fagocíticas capaces de liberar moléculas citotóxicas como especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, proteasas y citocinas que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la ELA^{1, 17}.

1.6.1.7 Apoptosis

Actualmente se sugiere a la apoptosis como vía del proceso de muerte celular de las neuronas motoras de pacientes con ELA, sin embargo los marcadores bioquímicos de la apoptosis han sido detectados en las etapas terminales de la ELA. Dentro de los elementos clave de la ruta apoptótica se han visto involucrados la familia de las caspasas, (enzimas proteolíticas), en especial la caspasa 12; la familia de oncoproteínas Bcl2 (oncogenes antiapoptóticos y proapoptóticos) y la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (PIA)^{17,20}.

1.6.1.8 Factores genéticos

El estudio molecular de la enfermedad tanto en los casos esporádicos como en los familiares ha logrado identificar genes cuyas mutaciones se asocian a mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad, como: inclusiones proteicas, un mal procesamiento del RNA, disfunción mitocondrial ^{1, 17,19}, entre otras funciones.

1.7 Genética de la ELA

La identificación de mutaciones ha permitido determinar la participación de al menos 29 *loci* asociados a la enfermedad^{8,7}; algunos de ellos se consideran de mayor importancia para la patogénesis de la enfermedad debido a que se han asociado a un mayor número de casos tanto familiares como esporádicos alrededor del mundo, sin embargo estudios epidemiológicos han mostrado que tanto la frecuencia de genes como la frecuencia de las mutaciones varía de acuerdo a la población y a su localización geográfica^{10, 2}

Algunos de los genes reportados para ELA son: el gen de la superóxido dismutasa de CU/ZN (*SOD1*), el hexanucleótido repetido *C9ORF72*, el gen de la proteína TAR de unión a RNA (*TARDBP*), el gen de la proteína de unión al sarcoma (*FUS*), el gen de la proteína angiogenina (*ANG*), el gen de la proteína optoneurina (*OPNT*), el gen de la proteína ubiquitina (*UBQLN2*), el gen de la ataxina 2 (*ATXN2*), el gen que codifica para la proteína 2B modificadora de la cromatina (*CHMP2B*), el gen homólogo de SAC1 que contiene un dominio fosfatasa lipídica (*FIG4*), el gen de la profilina (*PNF1*), el gen de la proteína contenedora de valosina (*VCP*), el gen de la senataxina (*SETX*), el gen de la proteína B asociada a proteína de membrana asociada a vesículas (*VAPB*) y el gen de la alsina (*ALS2*). Sin embargo la mayoría de estos genes se asocian con fenotipos atípicos de ELA o casos especiales con una menor frecuencia como se muestra en los porcentajes relacionados a cada uno en la Tabla 3^{2, 4, 13, 14}.

Tabla 3: Genes asociados a la ELA

Gen	Locus	Proteína	Casos		
			Esporádica	Familiar	Herencia
SOD1	21q22	SOD1	7 %	20 %	AD
C9orf72	9p21	----	6%	20%	AD
TARDBP	1p36.22	TDP-43	≤ 1%	5%	AD
FUS	16q12	FUS	≤ 1%	5%	AD/AR
ANG	14q11	Angiogenina	-----	≤ 1%	AD
OPNT	10p13	Optoneurina	-----	≤ 1%	AD/AR
UBQLN2	Xp11	Ubiquitina-2	~ 1%	≤ 2%	XR
ATXN2	12q24	Ataxina-2	-----	≤ 1%	AD
CHMP2B	3p11	-----	-----	≤ 1%	AD
FIG4	6q21	FIG 4	-----	-----	AD
PFN1	17p13	Profilina	-----	2%	AD
VCP	9p13	VCP	≤ 1%	-----	AD
SETX	9q34	Senataxina	-----	-----	AR
VAPB	20q13	VAMP	≤ 1%	-----	AD
Alsina	2q33	ALS2	-----	-----	AR

Se presentan los genes principalmente asociados a la ELA, el porcentaje de casos explicados por estos para casos familiares y esporádicos, así como el tipo de patrón de herencia.

Las principales mutaciones que hasta el momento se han considerado son las descritas en los genes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *C9orf72* (Referencia).

En total, cerca del 50% de los casos mundiales de ELA (familiares como esporádicos) son explicados por mutaciones en los genes antes mencionados, sin embargo un 8% se explica por mutaciones en genes menos frecuentes y en el 42% restante no se ha identificado aun el factor genético¹³. (Figura 4)

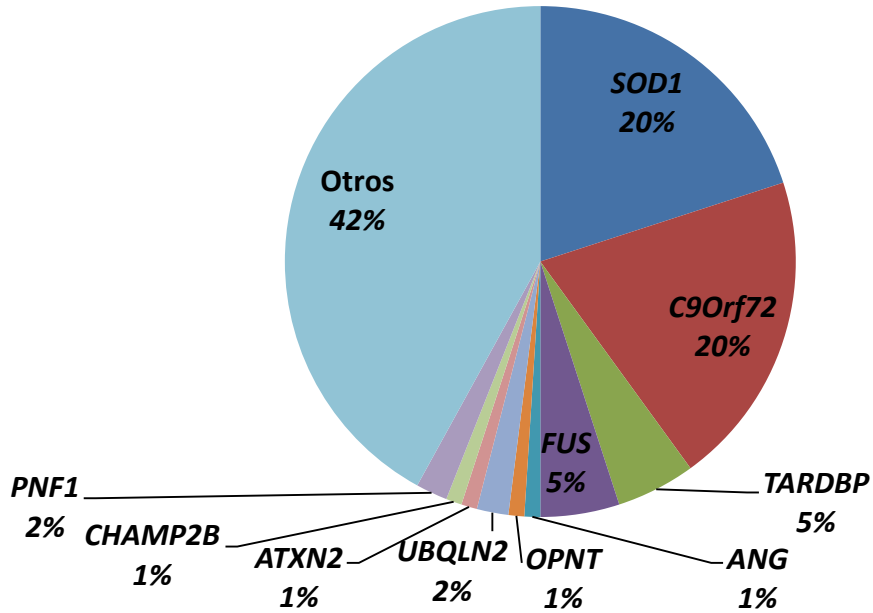


Figura 4: Genes asociados a ELAF

Se muestran los porcentajes asociados a cada uno de los genes causales de la ELA a nivel mundial.

1.7.1 *SOD1* (ELA 1)

La superóxido dismutasa 1 de Cu/Zn (*SOD1*) pertenece a una de tres isoformas (Tabla 4) de la proteína en el ser humano y se encuentra principalmente en el citosol así como en el espacio intermembranal de la mitocondria (EIM). La proteína *SOD1* es codificada por el gen *SOD1* localizado en el brazo largo del cromosoma 21 (21q22.1) y está compuesto por 5 exones; la proteína está constituida por 153 aminoácidos y se encuentra altamente conservada en la escala filogenética. Hasta el momento se han descrito más de 160 mutaciones relacionadas con la ELA, dentro de las cuales se pueden observar mutaciones puntuales de sentido erróneo, sin sentido, inserciones o deleciones.^{15, 16}

Tabla 4: Superóxido dismutasa

Isoforma	Características	Cofactores	Localización	Localización del Gen
SOD1	32kDa, homodímero	Cu ²⁺ catalítico Zn ²⁺ estabilidad	Citoplasma, EIM mitocondrial, núcleo, lisosomas y peroxisomas	<i>SOD1</i> <i>21q22.1</i>
SOD2	96kDa Homotetrámero	Mn ³⁺ catalítico	Matriz mitocondrial	<i>SOD2</i> <i>6q25.3</i>
SOD3	135kDa, Homotetrámero	Cu ²⁺ catalítico Zn ²⁺ estabilidad	Matriz extracelular, superficie de la célula y fluidos extracelulares	<i>SOD3</i> <i>4p15.2</i>

Los estudios realizados alrededor del mundo indican que la ELA, debida a mutaciones en el gen ***SOD1***, presentan un patrón de herencia autosómico dominante (AD); sin embargo, se han identificado casos donde la enfermedad se hereda de forma autosómica recesiva (AR) (Suecia y Finlandia). De igual forma se ha observado que la penetrancia puede ser incompleta y dependiente de la edad del paciente; debido a este fenómeno es que se ha logrado identificar diferentes mutaciones que no tienen ningún efecto claro sobre la actividad de la superóxido dismutasa, aunque se ha observado un ligero déficit en la actividad de la enzima sin llegar a límites patológicos^{1, 14}.

Las características clínicas de los pacientes en los cuales se han encontrado mutaciones en el gen ***SOD1*** son indistinguibles de aquellos pacientes con mutaciones en otro gen, sin embargo se ha observado que algunos de estos cambios en ***SOD1*** pueden alterar la severidad de la ELA, la edad de inicio o el tiempo de sobrevivencia, aún dentro de una misma familia.

1.7.2 ***TARDBP*** (ELA 10)

El gen ***TARDBP*** se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.21) y se conforma por 6 exones de los cuales uno es no codificante, codifica

para la proteína TAR de unión a DNA de 43 kD (TDP-43), la proteína fue identificada por primera vez como un represor transcripcional que se une al DNA TAR del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) en su región de repetidos largos terminales (LTR), de igual forma lleva a cabo la regulación de la expresión de genes y en el *splicing*. La proteína TDP-43 pertenece a la familia de proteínas heterogéneas nucleares y ribonucleares (hnRNP) altamente conservadas y se conforma de dos motivos de reconocimiento de RNA o **RRM's** (por sus siglas en inglés) y un dominio rico en glicina.^{19, 20}

Las mutaciones en TARDPB se han descrito en aproximadamente de 3 a 5% en casos familiares de ELA y en cerca del 1 % de los casos esporádicos con un patrón de herencia AD y alta penetrancia. Estas mutaciones son de sentido erróneo y se ha considerado al exón 6 (encargado de codificar la región rica en glicina) como un *hotspot* para el desarrollo de la ELA. (Figura 5).

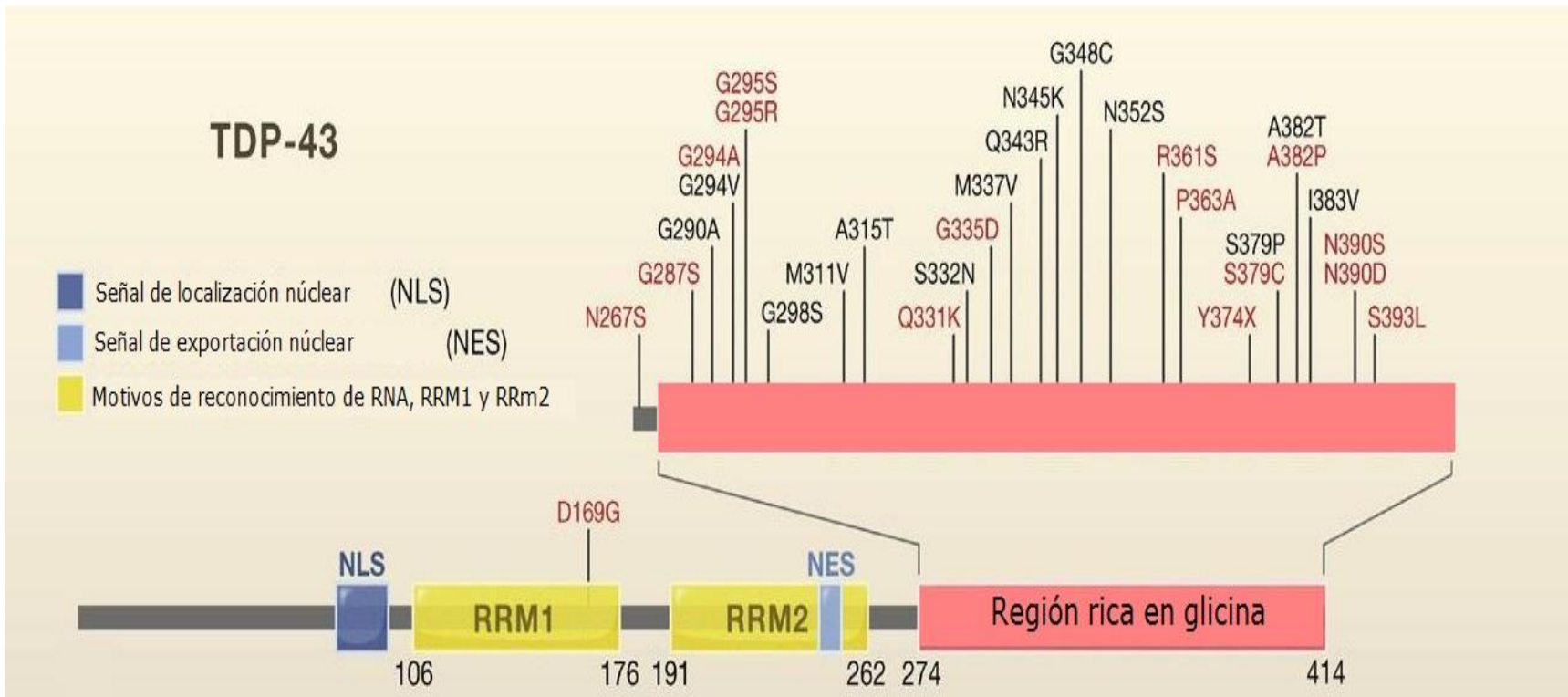


Figura 5: Estructura de la proteína TDP-43

Se muestra la conformación de la proteína TDP-43 y la localización de las mutaciones descritas en este gen. En negro se muestran las mutaciones asociadas a ELAF y en rojo las mutaciones asociadas a ELAE.²¹

Fenotípicamente la ELA debido a mutaciones en el gen *TARDBP* no presenta diferencia alguna con una ELA clásica; sin embargo estos pacientes desarrollaran demencia frontotemporal (DFT) y síntomas de neurona motora. La presencia de estos datos en pacientes con ELA/DFT ha llevado a la identificación de ambas entidades como parte de un mismo espectro clínico continuo, donde dependiendo de los genes mutados será el fenotipo del paciente como se muestra en la Figura 6.^{13, 14, 16.}

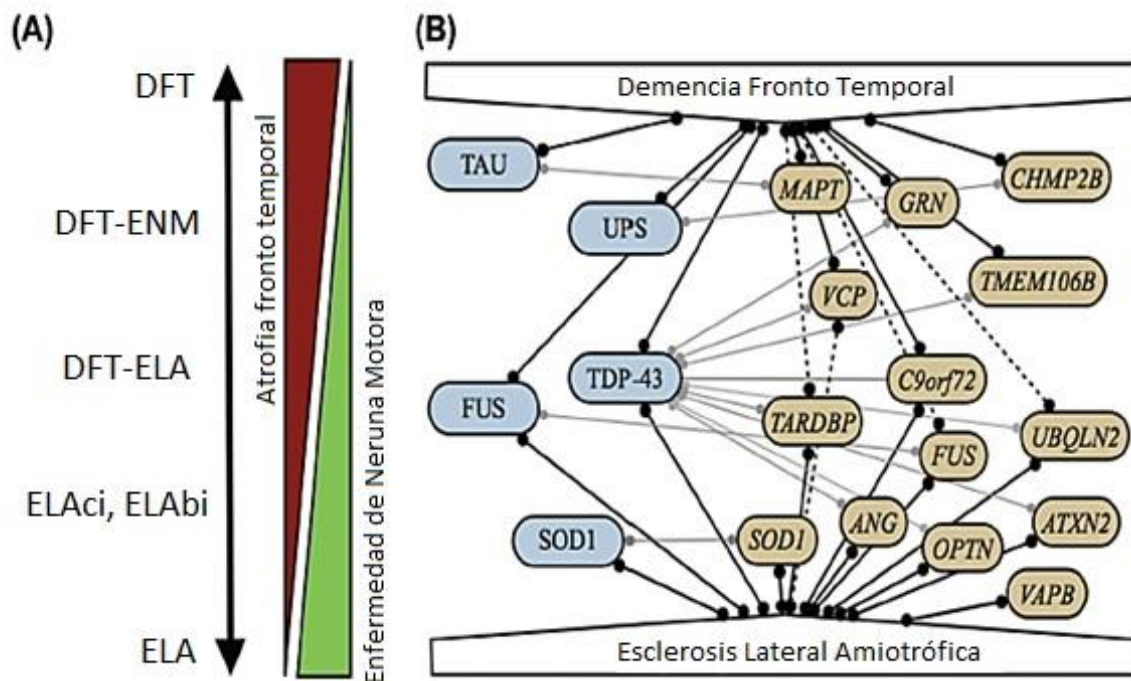


Figura 6: Espectro clínico ELA - DFT

(A) Se muestra la escala representativa del espectro clínico entre ELA y DFT y los diferentes tipos de fenotipo que se presentan. (B) En azul se muestran las proteínas patogénicas y su posición dentro del espectro clínico, en café se muestran los diferentes genes asociados a los diferentes fenotipos de ELA-DFT. ELAci = ELA con déficit cognitivo, ELAci = ELA con déficit de comportamiento, ENM enfermedad de neurona motora.⁴

1.8 Etiopatogenia Teorías

1.8.1 Superóxido dismutasa 1 de Cu^{2+}/Zn^{2+} (SOD1).

1.8.1.1 Estructura y actividad.

El estrés oxidativo se ha definido como el desequilibrio de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el organismo como son el ion superóxido O_2^{2-} , ion hidroxilo -OH, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entre otras; estas ROS causan un daño importante a la célula y a otras macromoléculas incluyendo al DNA por lo que el organismo debe de recurrir a diferentes vías para evitar este daño. La defensa más importante con la que cuenta el organismo es la actividad de tres enzimas conocidas como: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa y la catalasa.

La enzima SOD cuenta con tres isoformas que se localizan en diferentes regiones de la célula, la primera se trata de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc que se encuentra en el citoplasma (SOD1), la segunda isoforma se encuentra en el espacio mitocondrial y es dependiente de Manganeso (SOD2) y la tercera isoforma que se encuentra en el espacio extracelular (SOD3), que al igual que SOD1, es dependiente de cobre y zinc. Sin embargo todas catalizan la reacción de dismutación del ion superóxido en peróxido de hidrogeno como se muestra en la figura 7.

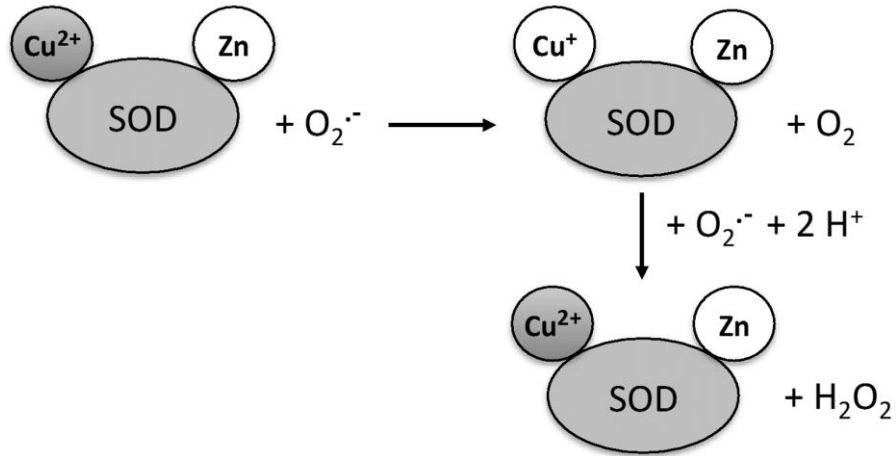


Figura 7: Reacción de la Superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1)

La proteína SOD1 cataliza la conversión del ion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que será convertido en agua por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa. Tomada de María Clara Franco, Et. al. (2013).

SOD1 está constituida por 153 aminoácidos con un peso de 16 kD que forman un homodímero con un átomo de cobre y uno de zinc en el sitio activo de cada subunidad.

El dímero de SOD1 (Figura 8) es extremadamente estable y está constituido por 2 subunidades, **donde se observa un barril β formado por ocho unidades β plegadas, desde los extremos de esta estructura se extienden dos bucles no helicoidales, uno de estos contiene residuos que ayudan a dirigir electrostáticamente al O_2^{2-} y el otro contribuirá a la dimerización del mismo. El sitio activo se localiza al final del barril β orientado hacia el exterior de la molécula, mientras que la otra subunidad se orienta de tal forma que los sitios activos de ambos quedan en los extremos opuestos de la enzima.**

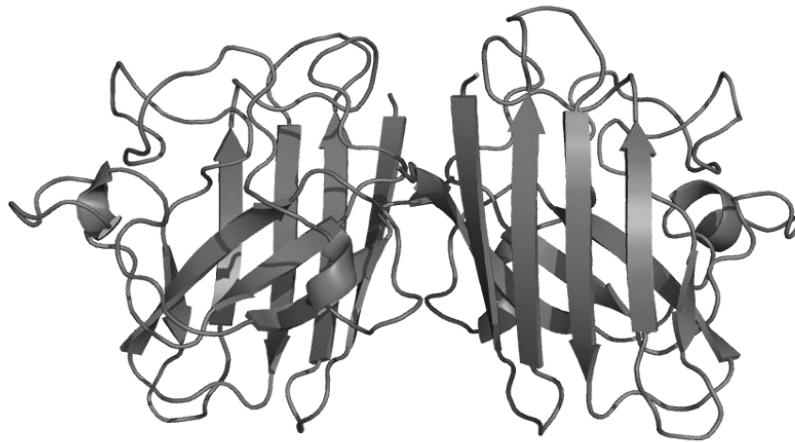


Figura 8: Estructura del dímero de la superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1)

Se puede observar una representación del homodímero de la proteína SOD1 donde como se puede apreciar las subunidades son idénticas y se encuentran en sentido invertido la una de la otra.⁴ Tomada de PROTEIN DATA BANK (PDB)

1.8.1.2 Mutaciones en *SOD1*

En 1993 se logró asociar a *SOD1* con la ELA y hasta el día de hoy se han identificado más de 160 mutaciones a lo largo de todo el gen *SOD1*. En un inicio los investigadores pensaban que las mutaciones reducían la actividad enzimática de la proteína SOD1, sin embargo se ha demostrado que muchas de las mutaciones en este gen no disminuyen la actividad de la proteína. Se han propuesto diversos mecanismos patogénicos a lo largo de los años sin llegar aún a conocer con exactitud la vía por la cual se lleva a cabo la muerte celular de las neuronas motoras.

Actualmente son dos las hipótesis que dominan la discusión acerca de la patogénesis de SOD1; la primera propone una función tóxica debido a la formación de inclusiones de proteína SOD mal plegada y que interactúan con otras proteínas de importancia para la célula, formando así agregados proteicos insolubles de mayor peso en la superficie de la membrana externa de la mitocondria como se puede observar en la Figura 9, estos agregados aumentan la probabilidad de tener una ganancia de función tóxica para la proteína en la neurona; estas inclusiones se han observado

en muestras de tejido de pacientes con ELA y en pacientes con enfermedades de neurona motora lo que lleva a pensar en rutas de daño neuronal similares para estas enfermedades. La segunda hipótesis habla sobre una ganancia de función tóxica por parte de la proteína causando un desbalance de especies reactivas de oxígeno lo que lleva al daño de la neurona por estrés oxidativo; también se ha observado de forma experimental en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA una disminución de la actividad de la enzima apoyando la teoría del daño neuronal por un aumento de ROS.

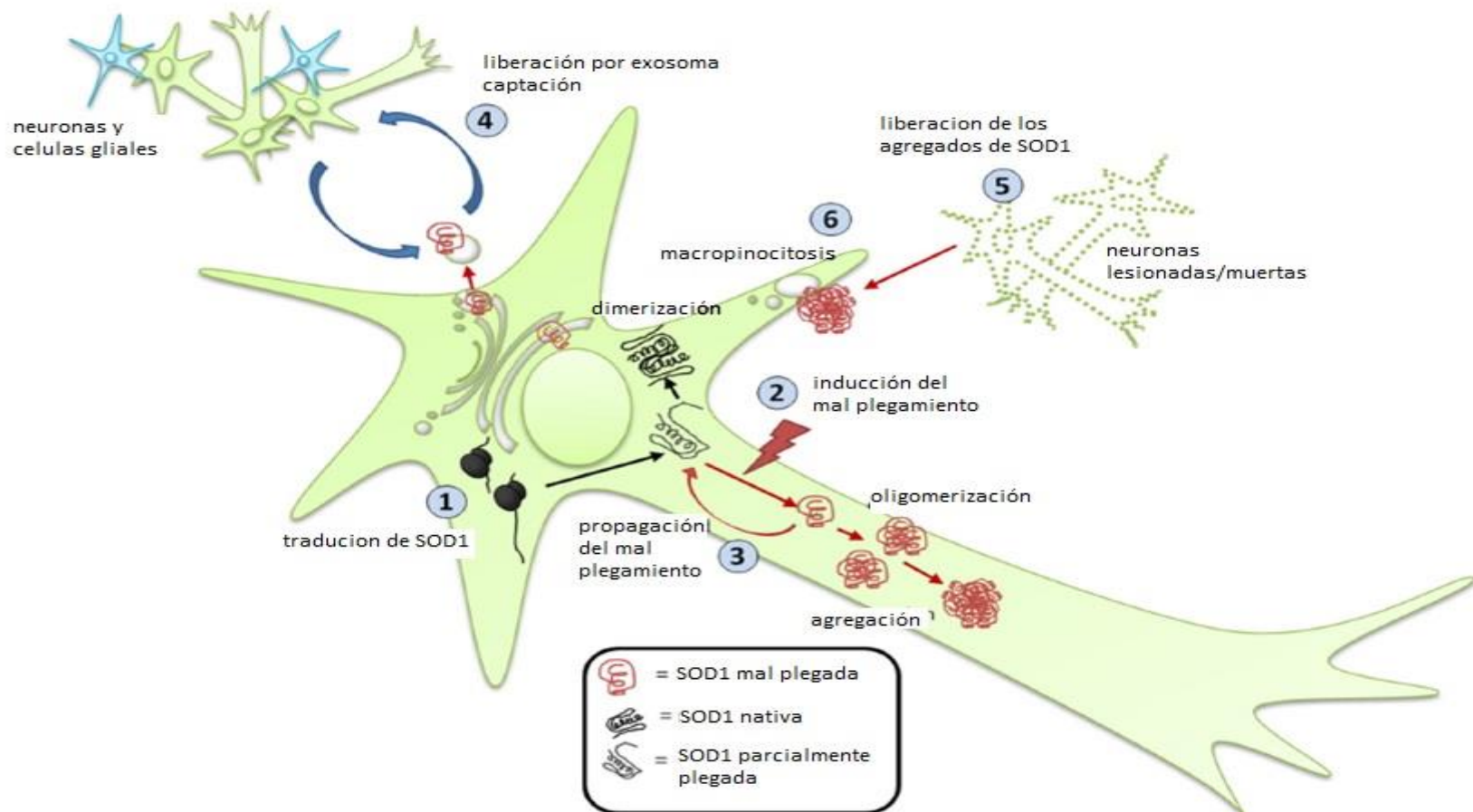


Figura 9: Esquema del posible mecanismo de agregación de la proteína SOD

Se muestran las diferentes fases que conforman el mecanismo por el cual se formaran los agregados de SOD. 1) se traduce el gen de la proteína y se produce una subunidad de SOD. 2) la subunidad de SOD parcialmente plegada puede inducir al mal plegamiento lo que llevará a una oligomerización y agregación de varias proteínas. 3) los oligómeros de proteína mal plegada continuarán la propagación del mal plegamiento en SOD. 4) por medio del exosoma es posible que se libere la proteína mal plegada y que esta sea captada por otras neuronas y células gliales vecinas. 5) tras la muerte de la neurona los agregados de proteína serán liberados al medio donde posiblemente por medio de 6) macropinocitosis sean captados por una nueva célula.

1.8.2 Proteína Tar de unión a DNA (TDP-43)

1.8.2.1 Estructura y actividad

La proteína TDP-43 fue descubierta por primera vez como una proteína de unión al DNA transactivo de respuesta (TAR DNA) en la región LTR del virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1). Esta proteína se encuentra en la mayoría de los tejidos, principalmente en el núcleo de la célula. TDP-43 funciona como proteína reguladora de la transcripción y tiene la capacidad de unirse al RNA para mantener la estabilidad de este, de igual forma esta proteína se ve envuelta en el procesamiento de los RNA mensajeros (mRNA's) y en el splicing alternativo de los mismos y puede influenciar una gran variedad de funciones celulares por medio de la regulación de la producción de proteínas en la célula.

TDP-43 está constituida por 414 aminoácidos, pesa 43 kDa y es codificada por el gen **TARDBP** que se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (1p36.22) y que está compuesto por 6 exones, contiene dos RRM's y una secuencia C-terminal rica en glicinas.

1.8.2.2 Mutaciones en TDP-43

Se han identificado al menos 50 mutaciones en el gen **TARDBP** y la mayoría de estas son cambios de un solo nucleótido, los cuales en su mayoría han sido identificados dentro de la región encargada del procesamiento del RNA, que es codificada por el exón 6 del gen. Las mutaciones en este gen causan un mal plegamiento de la proteína y la formación de inclusiones ubiquitinadas no amiloideas presentes en la patología de DFT y ELA; en pacientes se ha podido observar una disminución de la cantidad de proteína en el núcleo hacia el citosol lo que lleva a pensar que al disminuir la cantidad presente de la proteína en el núcleo existirá una pérdida de las funciones de esta proteína o se obtendrá una ganancia de función al encontrarse deslocalizada y formando inclusiones como se muestra en la

Figura 10. Sin embargo aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual se genera la ELA y la DFT por lo que no se puede asegurar si estas inclusiones forman parte de la vía patológica o son un resultado de la muerte celular. Se ha logrado establecer que para pacientes con ELAF y ELAE asociada a mutaciones en **SOD1** no se han encontrado este tipo de inclusiones lo que indica que la vía patológica por la cual se lleva a cabo la ELA es diferente para los casos con mutaciones en los genes de **SOD1** y **TARDBP**. Sin embargo aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual se genera la ELA y la DFT por lo que no se puede asegurar si estas inclusiones forman parte de la vía patológica o son un resultado de la muerte celular.

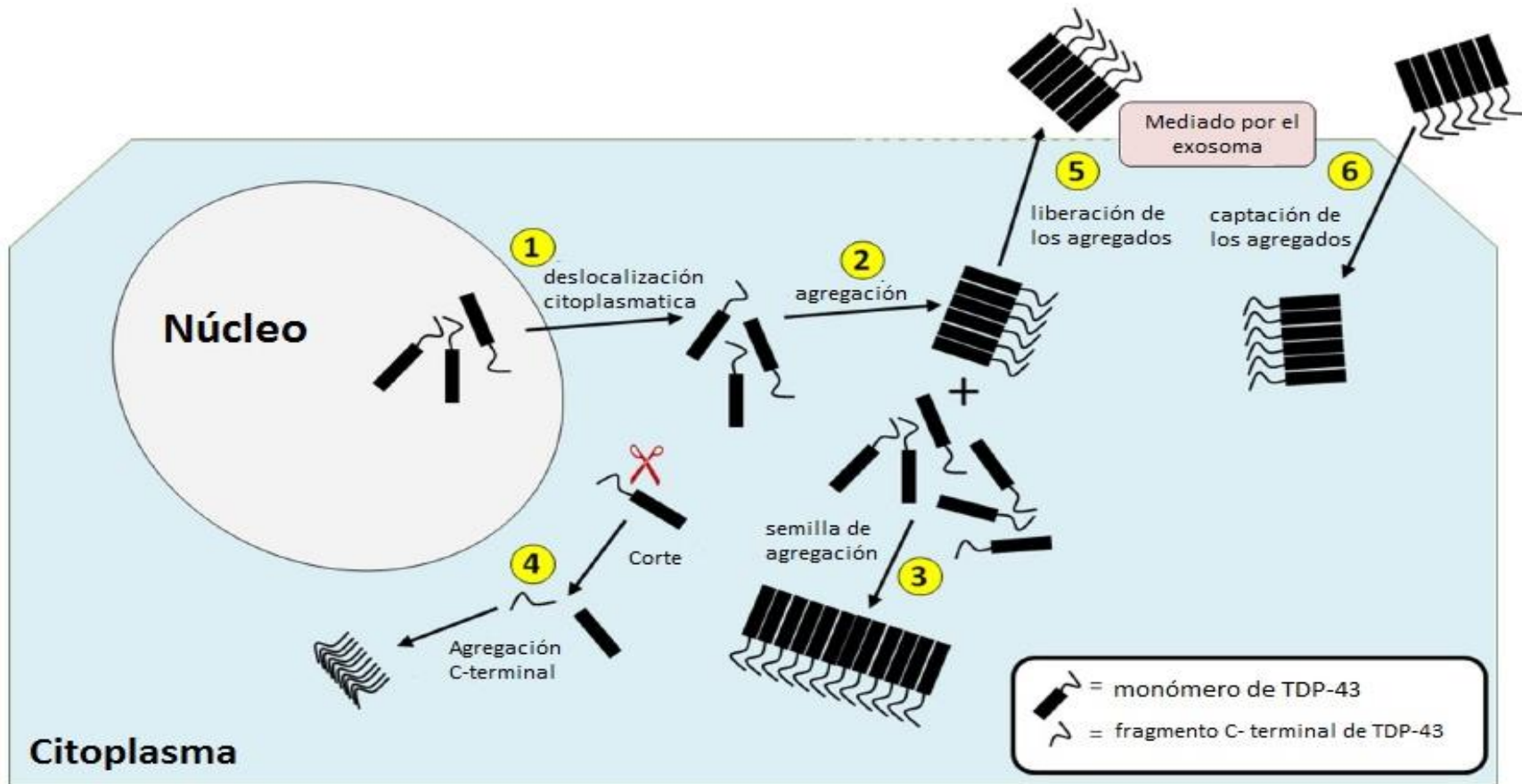


Figura 10: Esquema del posible mecanismo de agregación de la proteína TDP-43

Se muestran las diferentes fases que conforman el mecanismo por el cual se forman los agregados de TDP-43. 1) Los monómeros de proteína TDP-43 migran del núcleo al citoplasma. 2) TDP-43 comenzará a formar agregados en el citoplasma. 3) Los agregados presentes en citoplasma actúan como una semilla de agregación secuestrando a otras proteínas y más monómeros de TDP-43. 4) El monómero puede sufrir un corte en la porción C-terminal y estos fragmentos formarán otro tipo de agregados. 5) los agregados de proteína son liberados al medio extracelular, posiblemente por la vía del exosoma. 6) los agregados serán captados por una nueva célula donde se duplicará el ciclo.

2 Justificación

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de las neuronas motoras superior e inferior que sigue un curso progresivo con pérdida de la función motora. La enfermedad es fatal y aproximadamente el 50% de los pacientes mueren 3 a 5 años después de la presentación de los síntomas. La incidencia es de 2.4 casos por 100 mil habitantes por año; sin embargo, no se conoce predilección étnica y la prevalencia varía dependiendo de la región geográfica. Sin embargo en población mexicana no conocemos su frecuencia, ni cuáles son las principales mutaciones o polimorfismos de riesgo en pacientes con ELAF como ELAE.

Por lo que es importante determinar cuáles son las principales causas de este padecimiento en nuestra población. Debido a la dificultad en el diagnóstico clínico de la ELA será de gran beneficio conocer estos datos para el desarrollo de métodos diagnósticos confiables, que permitirán dar un asesoramiento genético oportuno y podrían ayudar a tener un mejor tratamiento para los pacientes.

3 Hipótesis

Los casos de ELA familiar y esporádica en población mestizo mexicana serán explicados en parte por mutaciones en *SOD1* y *TARDBP*.

4 Objetivos

4.1 Objetivos generales:

- Identificar variantes génicas en *SOD1* y *TARDBP* en pacientes mexicanos con Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica y familiar

4.2 Objetivos particulares:

- Establecer una asociación genotipo-fenotipo de acuerdo a las variantes identificadas en *SOD1* Y *TARDBP* en los pacientes con ELA.

5 Metodología

5.1 Sujetos

La población de estudio se integró por 40 pacientes con diagnóstico definido de ELA evaluados en la clínica de nervio y músculo del Instituto **Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) "Manuel Velasco Suárez"** captados en el periodo de 2013 - 2014; mayores de 18 años que cumplan con los criterios clínicos de inclusión. Los pacientes fueron evaluados por un neurólogo especializado el cual aplicó la Escala Funcional de ELA Revisada, así como exploración física general y neurológica, historia clínica y posteriormente el genetista elaboró el árbol genealógico de cada paciente.

Los pacientes fueron invitados a participar en el estudio, después de una explicación previa y firma de consentimiento informado se obtuvo una muestra de 15 mL de sangre periférica en 3 tubos colectores (Vacutainer) con anticoagulante ACD (ácido citrato dextrosa). Posteriormente, las muestras se etiquetaron para realizar la extracción de DNA genómico para la realización de las pruebas moleculares.

5.2 Criterios de selección del estudio

5.2.1 Criterios de inclusión

Pacientes con ELA clínicamente definida y/o clínicamente probable de acuerdo a los criterios diagnósticos de "El Escorial".

Pacientes mayores de edad o con la aprobación del padre o tutor.

Pacientes que acepten participar en el protocolo de investigación y que firmarán consentimiento informado.

5.2.2 Criterios de exclusión

Pacientes que no cumplen los criterios diagnósticos de "El Escorial".

Pacientes con diagnóstico de ELA que no aceptaron firmar el consentimiento informado o que no desearon participar en el estudio.

5.2.3 Criterios de eliminación

Pacientes que después de ser captados para el estudio comunicaron que desean dejar de participar en el estudio.

5.3 Extracción de DNA Genómico.

Para la extracción de DNA se empleó la técnica modificada de sales de Miller que está constituida por las siguientes etapas:

Se dividió la muestra de sangre en alícuotas de 3 a 4 mL y se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL, se adicionaron tres veces el volumen de BLGR (amortiguador de Lisis de Glóbulos Rojos: cloruro de amonio 0.155 M, bicarbonato de potasio 10 mM, EDTA 0.1 mM).

Se agitó el tubo, invirtiendo varias veces para lisar los eritrocitos de la muestra y los tubos cónicos fueron centrifugados a 3,000 rpm por 6 minutos para posteriormente decantar el sobrenadante.

Se resuspendió el paquete de leucocitos en 1 mL de BLGR y se transfirió a un microtubo de 1.5 mL y se agitó hasta homogenizar; posteriormente fueron centrifugados a 3,000 rpm por 2 minutos y se decantó el sobrenadante, conservando el botón de leucocitos.

Se adicionó nuevamente 1 mL de BLGR a cada tubo para resuspender el paquete de leucocitos de la muestra. Esta operación se repitió hasta obtener un botón libre de eritrocitos.

Se agregaron 570 μ L NaCl 5 mM y se agitó la muestra durante 2 minutos, posteriormente se adiciono 40 μ L de SDS 10% (v/v) y se homogenizó la muestra durante 5 minutos. Al término de este tiempo se añadieron 200 μ L de solución saturada de NaCl y se homogenizó la muestra durante 10

minutos, al finalizar las muestras fueron centrifugadas a 11,500 rpm por 20 minutos a 4°C.

El sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo de 1.5 mL y se adicionaron 600 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) a cada muestra y se homogenizo manualmente.

Las muestras fueron centrifugadas nuevamente a 14,000 rpm por 15 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL y se adicionó 600 µL de etanol absoluto para la precipitación del ADN.

Los tubos con el ADN fueron centrifugados a 14,000 rpm por 15 minutos y posteriormente se decantó el etanol, posteriormente se realizaron 2 lavados con 600 µL etanol al 70%.

Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 15 minutos y decantadas.

Para eliminar los residuos de etanol y de solventes orgánicos, el ADN fue secado en un concentrador de vacío por 40 minutos.

Finalmente cada muestra de ADN se re suspendió en 250 µL de agua estéril y se cuantificó por espectrofotometría a 260nm en un nanodrop (Nanodrop 2000 Thermo Scientific).

Además se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador SB 1%, teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) para determinar la calidad e integridad del ADN, posteriormente las muestras fueron almacenadas a -4 °C.

5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

5.4.1 *SOD1*

La amplificación por PCR de cada uno de los 5 exones de *SOD1* se realizó con los oligonucleótidos específicos descritos por Vela et al. (2011)¹ para cada uno de los exones en concentraciones y volúmenes específicos como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5: Mezcla de reacción para la amplificación de los exones del gen *SOD1*

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN μL
DNA	100 ng/ μL	1.33
Fast Master Mix		10
Oligonucleótido F*	10 μM	0.66
Oligonucleótido R*	10 μM	0.66
H₂O		7.35
Volumen Final		20

* Oligonucleótido correspondiente a cada uno de los 5 exones de *SOD1*

El programa de acuerdo al perfil térmico para la PCR del gen *SOD1* se estandarizó previamente tomando en cuenta las variables presentes en la tabla 6:

Tabla 6: Perfil térmico general de la técnica de PCR para el gen *SOD1*.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 seg	35
Alineación	Variable*	15 seg	
Extensión	72 °C	15 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1
Conservación	4 °C	∞	

*temperatura dependiente de la Tm del par de oligonucleótidos correspondiente a cada uno de los exones.

5.4.2 *TARDBP*

La amplificación por PCR para cada uno de los 6 exones del gen *TARDBP* se realizó empleando los primers referidos por Hui-Ling (2010)² en concentraciones y volúmenes específicos como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7: Mezcla de reacción para la amplificación de cada uno de los exones del gen *TARDBP*.

Reactivo	Concentración	Volumen μL
KAPA2G Robust Mix	10 x	12.5
Primer Forward*	25 μ M	1
Primer Reverse*	25 μ M	1
H₂O		9
DNA	100 ng/ μ l	1.5
Volumen Final		25

*oligonucleótido correspondiente a cada uno de los 5 exones de *TARDBP*

El programa de acuerdo al perfil térmico para la PCR del gen *TARDBP* se estandarizo previamente considerando las variables descritas en la tabla 8.

Tabla 8: Perfil térmico general para la técnica de PCR del gen *TARDBP*.

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	35
Alineamiento	Variable*	15 seg	
Extensión	72°C	15 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1

*temperatura dependiente de la Tm del par de oligonucleótidos correspondiente a cada uno de los exones.

5.5 Electroforesis

Los productos de PCR obtenidos fueron resueltos y visualizados utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 2.5%, se usó el amortiguador SB (ácido bórico, hidróxido de sodio) a una concentración de 1% y se empleó un marcador de peso molecular DNA

ladder de 100 pb (Fermentas®) y O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas®); el corrimiento electroforético se realizó a 100V durante una hora. El gel contiene bromuro de etidio que nos permitió visualizar los productos en un transiluminador de luz UV y posteriormente se digitalizó la imagen con un foto documentador de imágenes Biorad®.

5.6 Reacción de Secuenciación

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados empleando el estuche comercial QIAquick® PCR purification kit (250) de la marca QIAGEN; una vez purificados se realizó la reacción de secuenciación utilizando los reactivos del estuche comercial BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing descritos en la Tabla 9 y se empleó un termociclador (Axygen®) donde se llevó a cabo de acuerdo a el programa descrito en la Tabla 10.

Tabla 9: Reacción de secuenciación

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN μL
Producto de PCR	100 ng/ μ L	2
Amortiguador	5x	3.5
Oligonucleótido	10 μ M	1
BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing		1
H₂O libre de DNAsa		12.5
Volumen Final		20

Tabla 10: Programa de la reacción de secuenciación

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 seg	20
Alineamiento	50 °C	30 seg	
Extensión	60 °C	45 seg	

Elongación final	72 °C	5 min	1
Conservación	4 °C	∞	

Concluida la reacción de secuenciación esta se purificó por medio de columnas centrisep (Applied Biosystems) con Sephadex® G50 (Sigma).

Los productos purificados fueron secados en un concentrador de vacío y posteriormente hidratados con 14 µL de formamida de alta pureza (Formamida Hi-Di) y se desnaturalizó por 5 min a 94 °C para su posterior análisis en un secuenciador o analizador de ADN DNA AB3130 de Applied Biosystems.

6 Resultados.

6.1 Análisis de la muestra

Se analizaron 35 pacientes con ELAE y 5 con ELAF pertenecientes a 4 familias no relacionadas entre sí, en la Figura 11 se observa el porcentaje representativo de cada uno.

Pacientes

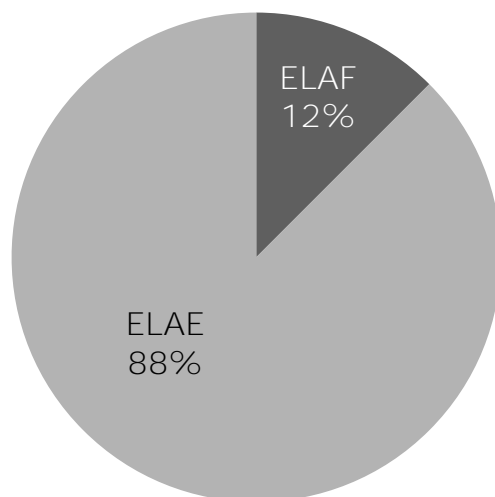


Figura 11: Porcentaje de casos familiares y esporádicos.

La edad de inicio promedio de la enfermedad, la media de duración de la misma y la distribución de género se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Características de la población estudiada

	ELAE	ELAF
Edad de Inicio Promedio	47.4 ± 12.4	45.5 ± 11.4
Rango	17 - 69	27 - 60
	ELAE	ELAF

Años de supervivencia Promedio	3.2 ± 2.5	6.2 ± 5.2
Rango	1 - 12	2 - 15
	Masculino	Femenino
Género	19	21
Porcentaje	47.5	52.5

6.2 Análisis de los productos de PCR

La amplificación de los exones 1 - 5 del gen **SOD1** se realizó a partir de las muestras de DNA genómico obtenidas de los pacientes y los tamaños de los productos amplificados correspondientes a cada uno de los 5 exones del gen se muestran en la Figura 12.

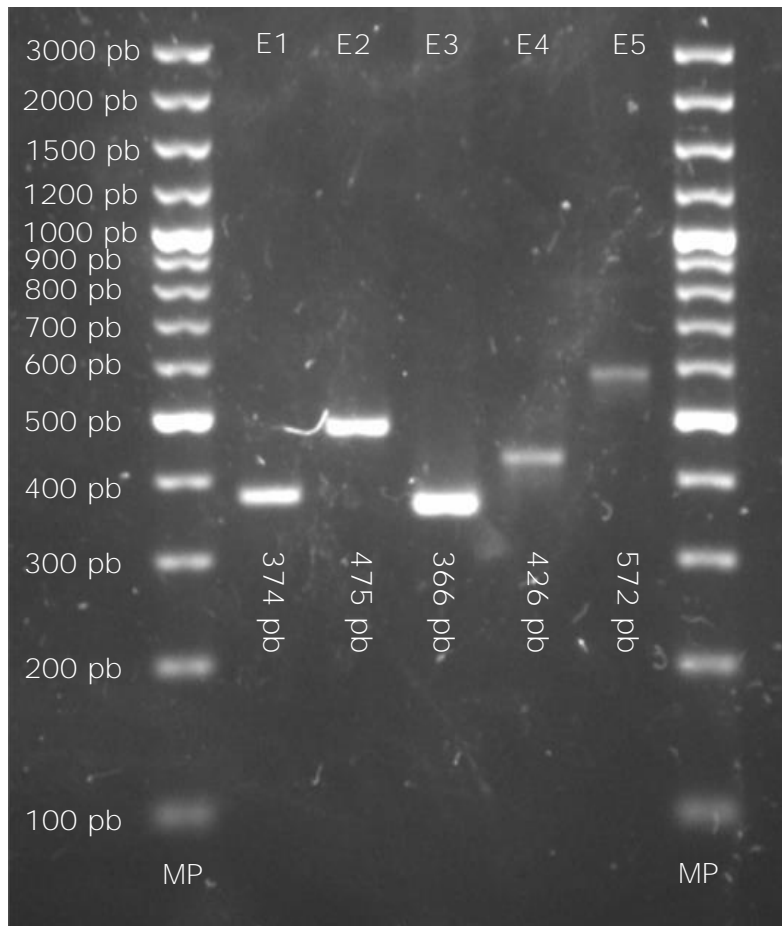


Figura 12: Gel de agarosa con los amplicones de los 5 exones del gen *SOD1*.

Se muestra la resolución de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2.5% flanqueados por un marcador de peso molecular (MP) GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. En los carriles 2 al 6 se muestran los productos de PCR de cada uno de los exones amplificados del gen *SOD1*, debajo del producto se encuentra su número correspondiente de pares de base (pb).

De igual manera se analizaron los 5 exones del gen *TARDBP*, a partir de las muestras de DNA genómico obtenidas de los pacientes y los productos amplificados obtenidos se muestra en la Figura 13.

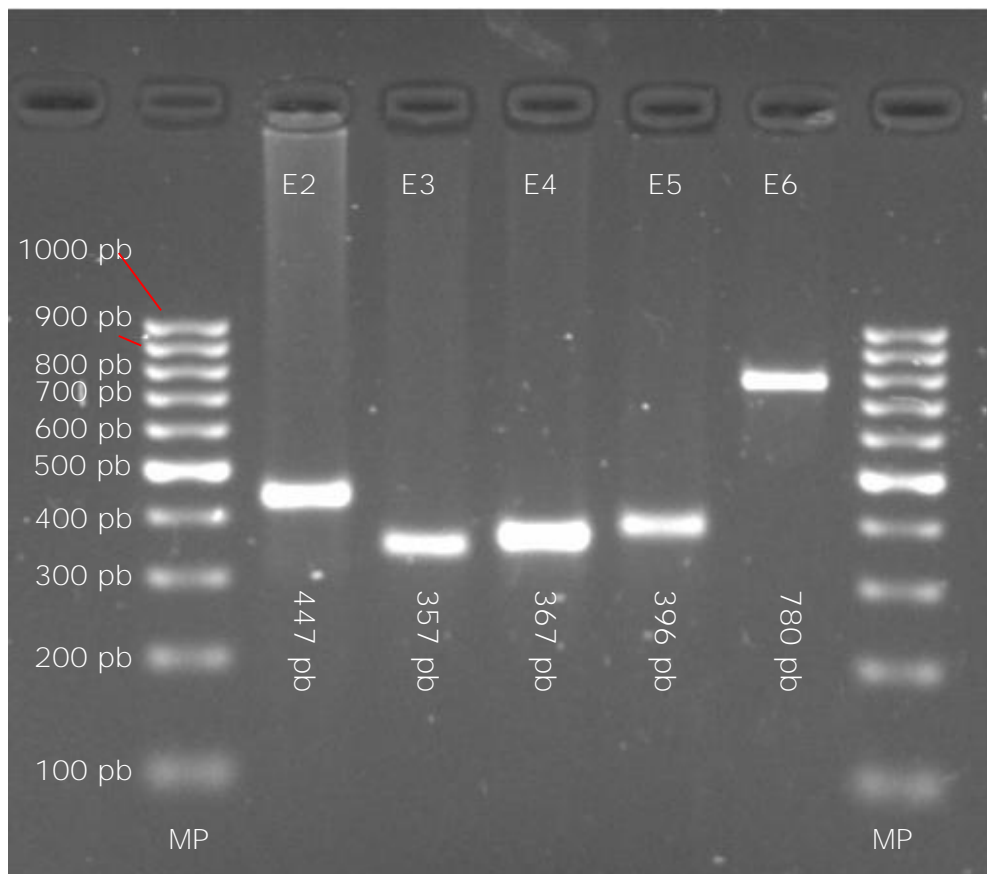


Figura 13: Gel de agarosa con los amplicones de los 5 exones codificantes del gen *TARDBP*.

Se observa la resolución de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2.5% flanqueados por un marcador de peso molecular (MP) GeneRuler 100 bp DNA Ladder donde se muestran del exón 2 al 6 del gen *SOD1*, debajo del producto se encuentra su número correspondiente de pares de base (pb).

6.3 Mutaciones encontradas en el gen *SOD1*.

De los 40 pacientes analizados solo en 4 casos se encontraron mutaciones para el gen *SOD1* (12.5%) y pertenecen a 3 familias por lo que representan el 80% de los casos familiares. Las 3 mutaciones se identificaron en los exones 1, 2 y 4 del gen como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Variantes identificadas en pacientes con ELA familiar

Familia	Núm. de Casos	Mutación	Localización	Cambio
1	2	p.A90T	Exón 4 SOD1	Alanina > Treonina
3	1	p.H47R	Exón 2 SOD1	Histidina > Arginina
4	1	p.C7S	Exón 1 SOD1	Cisteína > Serina

6.3.1 Familia 1

En la Figura 12 se presentan los electroferogramas parciales de los dos casos que conforman a la familia 1 y donde se ha identificado la mutación p.A90T; mientras que en la figura 14 se muestra la secuencia parcial control y mutada donde se muestra la substitución y el cambio en el codón.

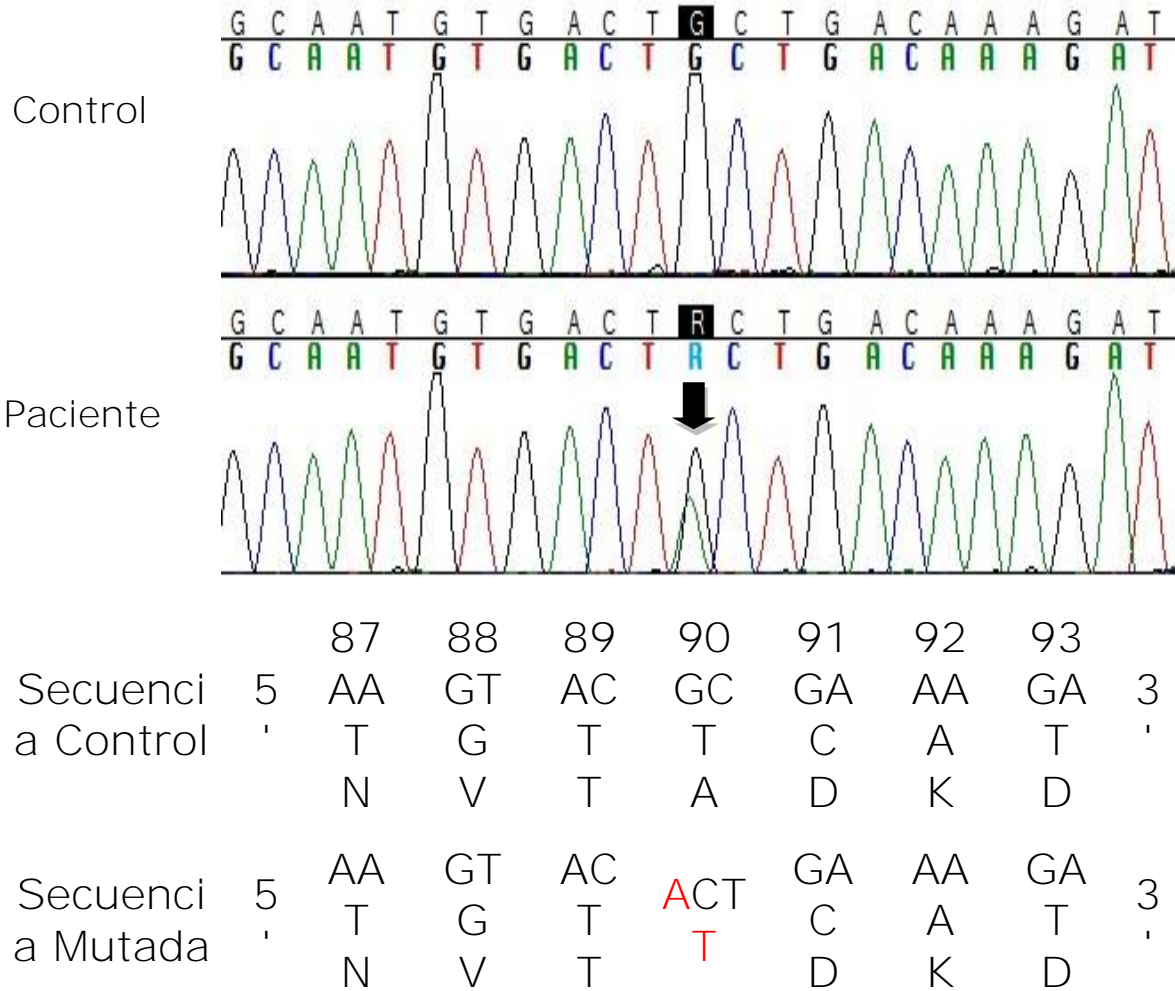


Figura 14: Electroferogramas parcial de muestra control y de paciente con mutación en el exón 4 de SOD1.

La flecha indica el cambio de G > A que ocasiona la mutación. La sustitución causa el cambio del codón 90 de una Alanina (A) por una Treonina (T) p.Ala90Thr.

La mutación en esta familia sigue un patrón de herencia autosómico dominante como se muestra en el árbol genealógico (Figura 15). La correlación clínica mostró la presencia de una serie de síntomas característicos asociados a la mutación encontrada en esta familia y el cuadro clínico se describe en la Tabla 13.

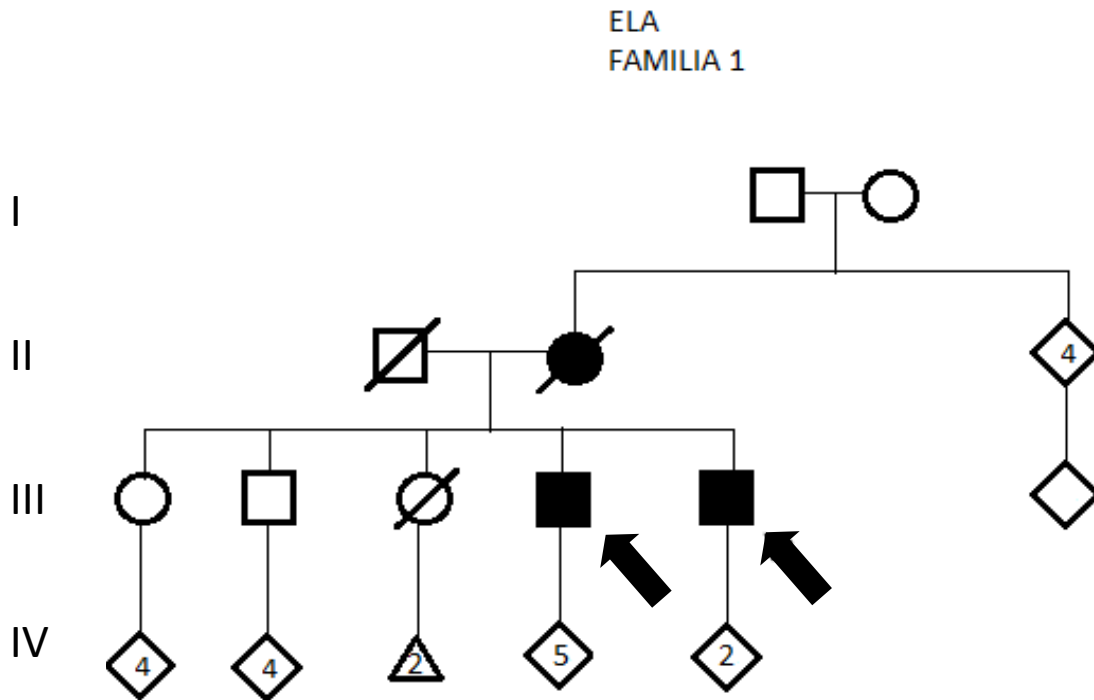


Figura 15: Árbol genealógico de la familia 1

En color negro se observan los miembros afectados y se puede observar como la enfermedad sigue un patrón de herencia AD. Marcados con una flecha se encuentran los casos índices.

Tabla 13: Características clínicas Familia 1

Caso	Género	Edad	Edad inicio	Sobrevivida	Alteraciones sensitivas	Forma de presentación	Patrón de herencia
II-2	F	70 †	67	3	Positivo	S/A	AD
III-4*	M	58	49	9	Positivo	Típica/espinal	
III-5*	M	54	52	3	Positivo	Típica/espinal	

*: casos índice, S/A: sin antecedentes, NP: no presente, AD: autosómico dominante
†: Finado

6.3.2 Familia 3

La familia 3 conformada por 31 individuos en donde 12 están afectados a lo largo de 4 generaciones, en esta familia se identificó la mutación p.H47R que fue previamente estudiado el caso IV-4 (13 años antes) y se confirmó la misma mutación en otro miembro de la misma generación afectado, en la figura 16 se muestran los electroferogramas parciales de una muestra control y mutada del exón 2 donde se muestra la mutación.

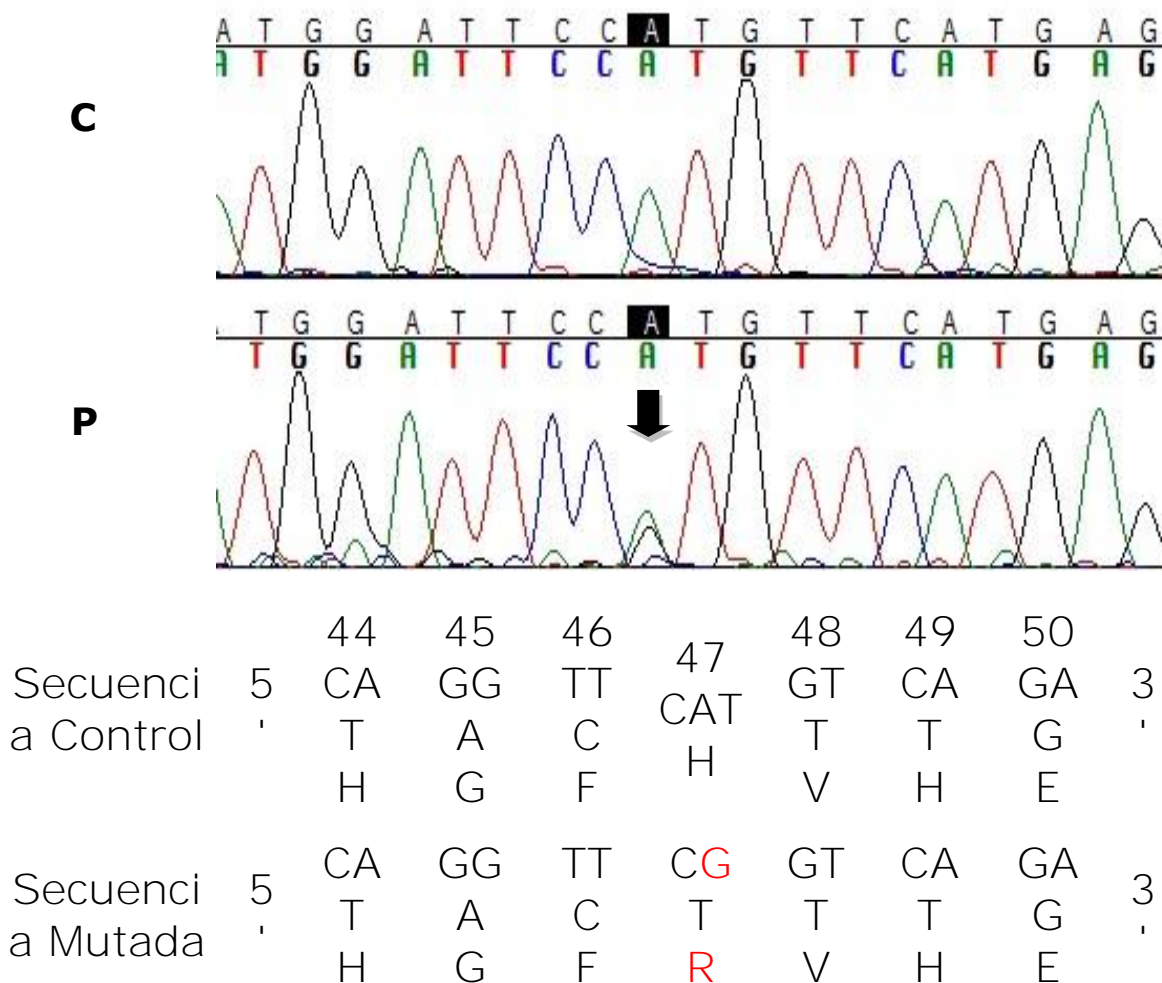


Figura 16: Electroferogramas parcial de una secuencia control (C) y mutada (P) del exón 2 de SOD1.

La flecha indica el cambio de una A > G ocasiona la mutación. La substitución de causa el cambio del codón 47 de una Histidina (H) por una Arginina (R). p.His47Arg

La mutación p.H46R se hereda también con un patrón de herencia autosómico dominante como se puede observar en el árbol genealógico (Figura 17), clínicamente esta mutación se caracteriza por un periodo largo de supervivencia, un tipo de inicio de la enfermedad específico; sin embargo, el inicio es más temprano en las generaciones sucesivas como se observa en la genealogía, en la tabla 14 se muestran las principales características clínicas de esta familia.

Tabla 14: Características clínicas de la Familia 3

Caso	Género	Edad	Edad inicio	Sobrevivida	Forma de presentación	Sitio de Inicio	Patrón de herencia
III-3	M	58 †	43	15	Típica/espinal		AD
IV-4	M	40 †	30	10	Típica/espinal	Miembros Inferiores	
IV-7*	M	32	27	5	Típica/espinal	Miembros Inferiores	

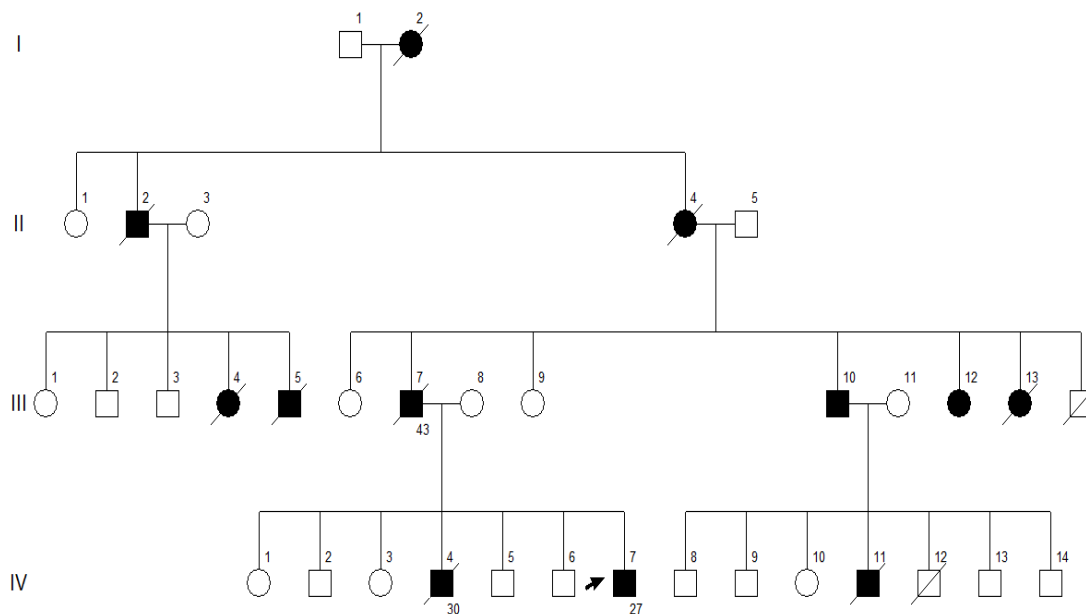


Figura 17: Árbol genealógico de la familia 3

En color negro se resaltan a los individuos afectados. La flecha indica el caso índice y también se muestra la edad de inicio de la enfermedad en los familiares del caso índice.

6.3.3 Familia 4

Se analizó la muestra del caso índice perteneciente a la familia 4, en este se identificó la mutación p.C7S y también presenta un patrón de herencia AD como se puede ver en el árbol genealógico (Figura 19); en la figura 18 se muestran los electroferogramas parciales de una secuencia control y mutada donde se identifica la sustitución y el cambio de codón que produce. La correlación clínica de esta familia se muestra en la tabla 15.

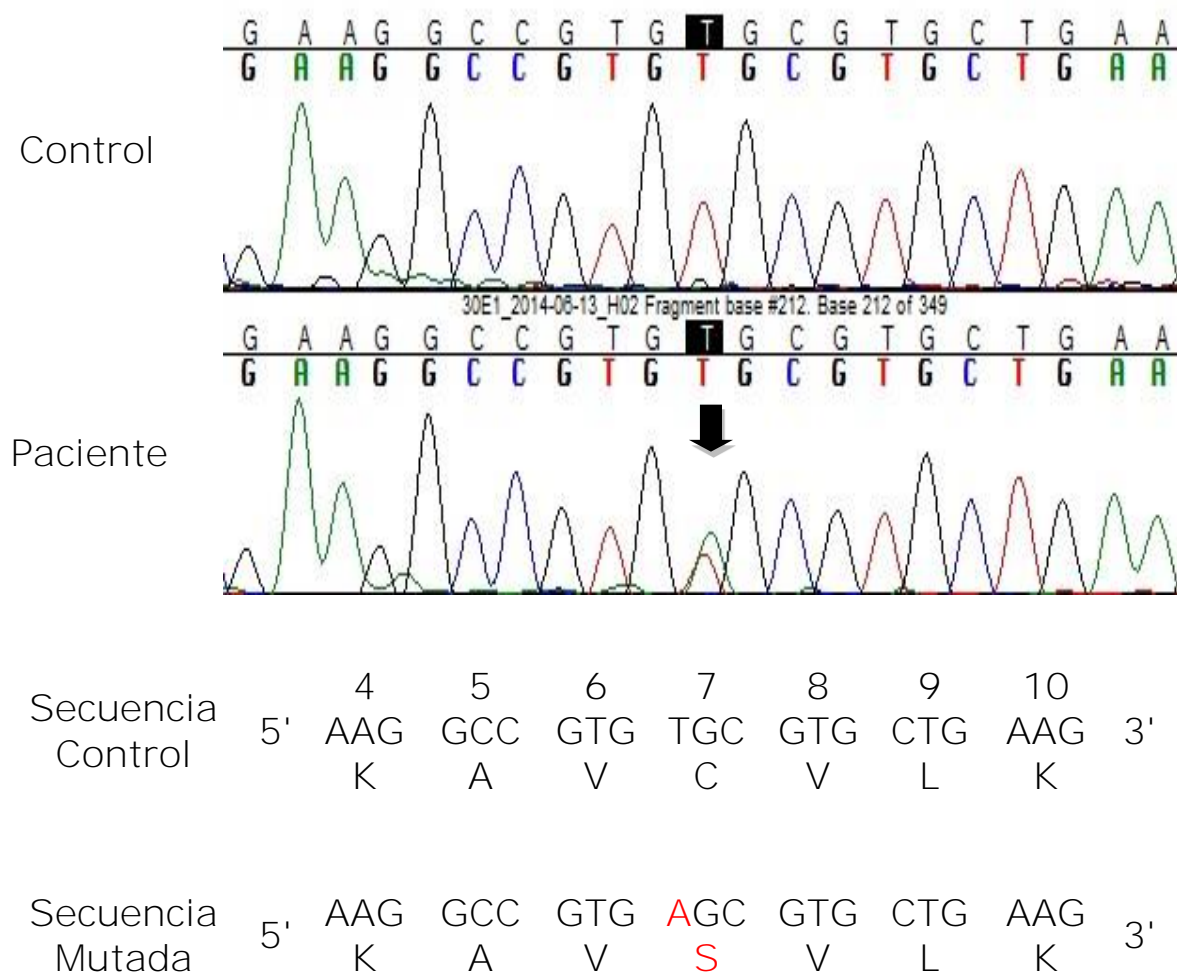


Figura 18: Electroferogramas parcial parciales de secuencias control y mutada del exón 1 de SOD1.

La flecha indica el cambio de T > A que ocasiona la mutación. La sustitución causa el cambio del codón 7 de una Cisteína (C) por una Serina (S). p.Cys7Ser.

Tabla 15: Características clínicas Familia 4

Caso	Género	Edad	Edad inicio	Sobrevida	Forma de presentación	Sitio de Inicio	Patrón de herencia
II-2	F	62	54	8	Típica/espinal	Miembros Inferiores	AD
III-3	F	64	???	???		Miembros Inferiores	
III-4	F	62	45+	17	Típica/espinal	Miembros Inferiores	
III-5*	F	60	45	15	Típica/espinal	Miembros Inferiores	

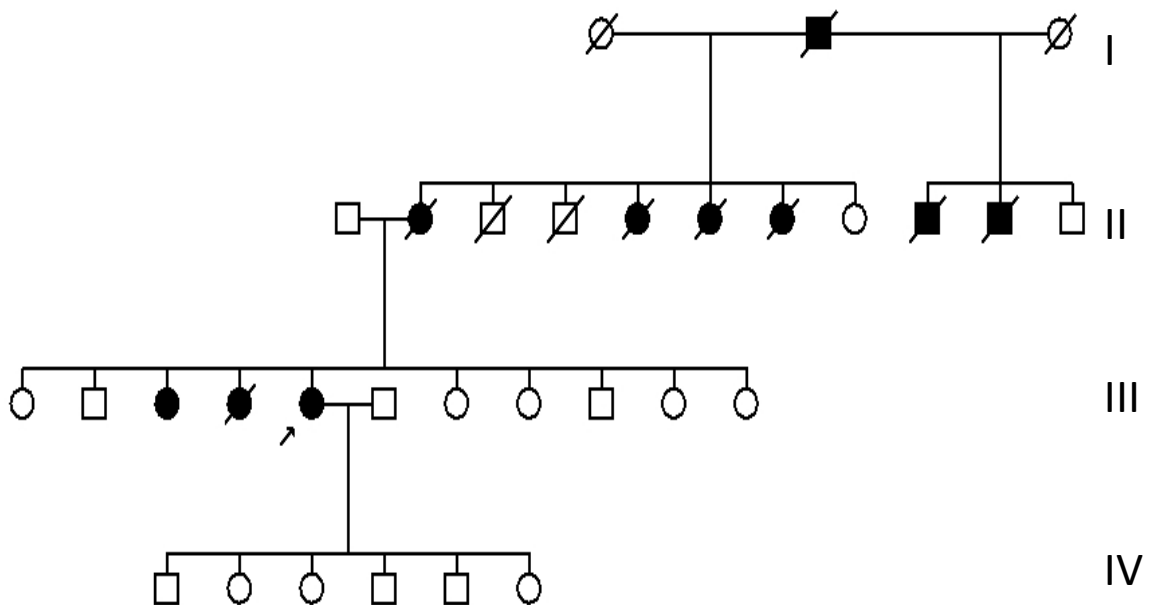


Figura 19: Árbol genealógico de la Familia 4

En la figura se puede observar como la enfermedad sigue un patrón de herencia autosómico dominante. La flecha indica el caso índice.

6.3.4 Familia 2 y casos esporádicos.

En un caso familiar no se identificaron mutaciones en ninguno de los genes estudiados y tampoco se encontró en los 35 casos esporádicos. En la Tabla 16 se muestran las características de esta última familia, el árbol familiar se muestra en la Figura 20.

Tabla 16: Características clínicas Familia 2

	Edad	Edad inicio	Sobrevida	Forma de presentación	Déficit cognitivo	Patrón de herencia
II-3	83†	79	4	Típica/espinal		AD
III-1	¿	¿	-----	DFT		
III-3	50†	48	2	Típica/espinal		
III-4	48†	45	3	¿		
III-8*	44	39	5	Típica/espinal	+	

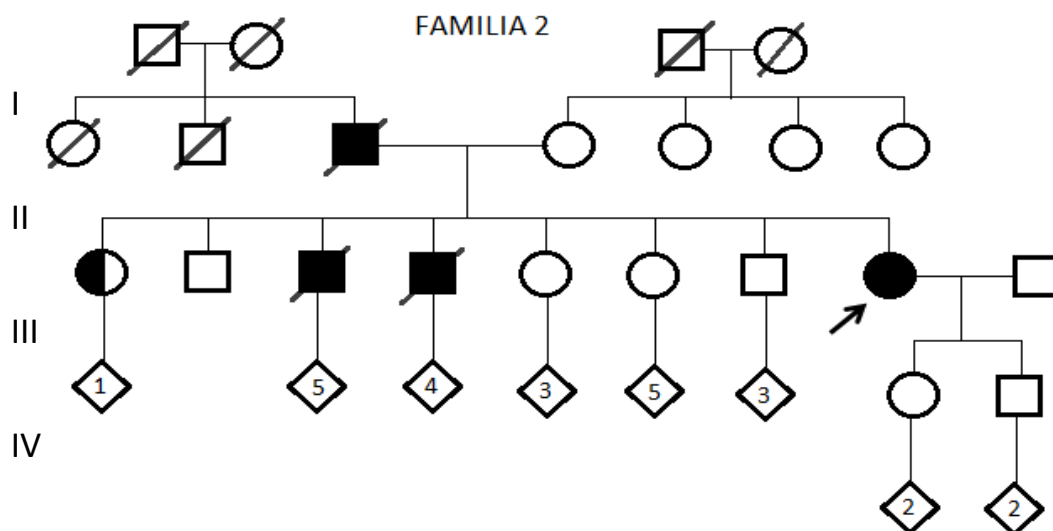


Figura 20: Árbol genealógico de la Familia 2

En la figura se puede observar como la enfermedad sigue un patrón de herencia autosómico dominante, el sujeto III-1 marcado como un círculo con la mitad de color negro presenta datos clínicos de DFT. La flecha marca al paciente índice.

7 Análisis de resultados y discusión

Se ha descrito en la literatura que las diferentes mutaciones en SOD1 causan la ELA sin embargo muestran diferencias en la penetrancia, edad de inicio, tiempo de sobrevida y manifestaciones clínicas. Como se mostró en la tabla 13 en nuestra muestra se han identificado en un pequeño número de pacientes con ELAF tres mutaciones puntuales de forma heterocigota, las tres variantes identificados son mutaciones de sentido erróneo (*missense*) que se dan por un cambio de aminoácido: la sustitución A90T en el exón 4, H47R en el exón 3, y C7S en el exón 1. Estas mutaciones causan sustituciones de aminoácidos muy conservados en la estructura de la proteína SOD1 y son las únicas alteraciones nucleotídicas encontradas en la región codificante.

Mediante el programa PolyPhen-2 se puede predecir las consecuencias funcionales debidas al cambio de un aminoácido en la estructura de las proteínas, empleando esta herramienta se encontraron las posibles repercusiones de los cambios encontrados para cada uno de los casos identificados y que a continuación serán descritas cada una.

7.1 Mutación p.A90T

El cambio puntual A90T (antes p.A89T) ya ha sido reportada previamente en población estadounidense⁵, en este estudio refieren que los pacientes que presentan esta mutación iniciaban con síntomas en los miembros inferiores así como mayores periodos de sobrevida y "sensación de calor intermitente" en los miembros inferiores, al realizar la evaluación clínica en nuestros casos se identificó que el paciente III-4 de la familia 1 presenta una sobrevida de 9 años, su hermano el paciente III-5 lleva 3 años de sobrevida; ambos hermanos tuvieron un inicio típico de ELA localizado también en miembros inferiores y refirieron alteraciones sensitivas. De acuerdo a la correlación genotipo fenotipo los pacientes de

nuestra serie fueron identificados como positivos para la mutación p.A90T y comparten el fenotipo presente en los casos reportados en 2003 por Andersen et al. y las consecuencias de esta mutación se observaron de acuerdo al análisis de Polyphen.

7.2 Mutación p.H47R

El segundo caso identificado corresponde a la mutación p.H47R (antes p.H46R) causada por el cambio de una adenina por una guanina en el nucleótido 140, esta mutación fue reportada por primera vez por Aoki y colaboradores en familias de origen japonés, estos casos presentaban un fenotipo moderado de ELA en comparación a los casos típicos en donde la progresión es más rápida, al igual que con nuestros pacientes existe una progresión lenta de los síntomas hasta alcanzar periodos de sobrevida de 17 a 20 años o más. Los síntomas inician en miembros inferiores, mientras que los miembros superiores no se ven afectados después de un periodo de 5 años del inicio de la enfermedad, mientras que los síntomas bulbares se presentaron después de 8 años de evolución.

Esta mutación fue identificada en la familia 3 en donde se tienen antecedentes de 12 familiares afectados; sin embargo, solo en 2 se realizó el estudio molecular. Los pacientes III-3 y IV-4 tienen un periodo de sobrevida de 15 y 10 años y actualmente el paciente IV-7 se encuentra aún con vida (hasta junio 2015) con un tiempo de progresión de 5 años. Por lo que el fenotipo de estos pacientes es considerado moderado.

Estos pacientes aún no desarrollan síntomas bulbares y el análisis en Polyphen-2 nos indica que esta variante es patogénica, ya que la mutación p.H47R afectará a uno de los cuatro sitios de unión del ion Cu^{2+} en el sitio activo de la proteína, por lo que se espera cause una pérdida de la actividad de SOD1, debido a la inestabilidad de la proteína por la falta de

unión del ion metálico. La inestabilidad aumenta la tendencia de la proteína a formar agregados.

7.3 Mutación p.C7S

En la familia 4 como se indica en la Tabla 13, fue identificada la mutación p.C7S (antes p.C6S) esta mutación fue descrita por primera vez en pacientes Afroamericanos⁶ donde también se ha observado una progresión más lenta de la enfermedad. La paciente III-5 de la familia 4 presentó un inicio típico espinal con inicio en miembros inferiores y con un periodo de sobrevida de 15 años.

El análisis en Polyphen-2 indica que es una mutación dañina y su importancia se debe a que afecta uno de los cuatro residuos de cisteína en la proteína y se piensa están relacionada con la toxicidad y agregación de SOD1.

7.4 Discusión

La mutación H47R es de las más estudiadas y se ha demostrado que esta afecta directamente el sitio de unión del cobre en la proteína por lo que tendrá una menor actividad (70%). Sin embargo, se ha demostrado que este cambio que sufre la proteína es compensado por residuos adyacentes, lo que puede rescatar parte de su función y esto se ha relacionado directamente con periodos de mayor supervivencia en los pacientes portadores de la misma.

La mutación C7S inicialmente se estudió en modelos de ratón y posteriormente se reportaron los primeros casos en población afroamericana, los cuales se caracterizaban por grandes periodos de sobrevida (más de 10 años). Esta mutación condiciona a la formación de agregados, que a pesar de ser aparentemente más solubles presentan un

efecto tóxico mayor a diferencia de lo observado en otras mutaciones, sin embargo esto está aún en discusión.

Para la mutación A90T aún se desconoce el mecanismo exacto de esta variante en la enfermedad; sin embargo, se ha descrito que los pacientes con esta mutación desarrollan síntomas bulbares específicos como la alteración sensitiva que es un síntoma poco común que se presente en los casos de ELA.

En cuanto a los pacientes donde no se encontraron mutaciones en ninguno de los genes estudiados, no se puede descartar la posibilidad de que existan otras mutaciones asociadas a la enfermedad las cuales no fueron analizadas en este estudio, así como la presencia de nuevos genes aún no descritos. La familia 2 que presenta antecedentes de demencia en la familia, así como un déficit cognitivo en el caso índice nos lleva a evaluar otros genes implicados en el reciente espectro clínico de ELA-DFT como pueden ser los genes ***C9orf72, FUS y PGRN.***

La correlación genotipo-fenotipo entre la variante génica y el cuadro clínico presente en cada paciente esta mediada por la región en la que se ubica la mutación, como afecta a la función y estructura de la proteína. Estas mutaciones ya fueron descritas en otras poblaciones y al igual que ellos, nuestros pacientes presentan características clínicas similares.

8 Conclusiones

Se identificaron las mutaciones C7S, H47R y A90T en 4 pacientes con ELA familiar, lo cual corresponde al 12.5% de la muestra estudiada.

En este estudio no se identificaron mutaciones en el gen *TARDBP* en los pacientes analizados.

En los pacientes que no presentaron mutaciones en ninguno de los genes estudiados, no se descarta la posibilidad de la presencia de otros genes asociados a la ELA.

Se estableció una asociación genotipo-fenotipo entre las mutaciones encontradas y los síntomas observados para cada uno de los pacientes.

Los resultados obtenidos contribuyen a mejorar el conocimiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica en población mexicana.

9 Referencias

1. Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(11):806-819. doi: 10.1038/35097565.
2. Lokesh C Wijesekera, P Nigel Leigh, Review: Amyotrophic lateral sclerosis, *Orphanet Journal of Rare Disease*, 2009, 4:3
3. Matthew B. Harms, Robert H. Baloh, Clinical Neurogenetics, Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Neurol Clin* 31 (2013) 929–950.
4. Data from Byrne S, Bede P, Elamin M, et al. Proposed criteria for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2011; 12(3):157–9.
5. M C Kiernan, S Vucic, Amyotrophic lateral sclerosis; *The Lancet* 2011; 377: 942–55
6. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 81: 385–90.
7. Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis, *J Neurol Sci* 1994; 124 (Suppl.): 96-107
8. Davenport RJ, Swingler RJ, Chancellor AM, Warlow CP on behalf of the Scottish Motor Neuron Disease Research Group. Avoiding false positive diagnoses of motor neuron disease: lessons from the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60: 147-151.
9. Murray B. Natural history and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. In: Mitsumoto HP, Gordon PH, editors. *Amyotrophic lateral sclerosis*. 1st edition. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 227–55.
10. Daniela Sau et. Al., Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function, *Human Molecular Genetics*, 2007, Vol. 16, No. 13.
11. Alavi et. Al., Genetic analysis and SOD1 mutation screening in Iranian amyotrophic lateral sclerosis patients, *Neurobiology of Aging*; 34 (2013).
12. Vikram K. Mulligan, Et.al, Early Steps in Oxidation-Induced SOD1 Misfolding: Implications for Non-Amyloid Protein Aggregation in Familial ALS; *J. Mol. Biol.* (2012) 421, 631–652.
13. Nicola Ticozzi, Cinzia Tiloca, et.al, C9orf72 repeat expansions are restricted to the ALS-FTD spectrum; *Neurobiology of Aging*, 2013.
14. H.G. Stewart et al., Corticomotoneuronal dysfunction in ALS patients with different SOD1 mutations, *Clinical Neurophysiology* 117 (2006) 1850–1861.

15. Yoshihisa Koyama, Familiar amyotrophic lateral sclerosis (FALS)-linked SOD1 mutation accelerates neuronal cell death., *Neurochemistry International* 57 (2010) 838–843.
16. R.M. Liscic, D. Breljak, Molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* ,35 (2011) 370–372.
17. Ammar Al-Chalabi, Ashley Jones,et.al., The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis; *Acta Neuropathol* (2012) 124:339–352.
18. C. Gellera N. Ticozzi, ATAXIN2 CAG-repeat length in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis: risk factor or variant phenotype? Implication for genetic testing and counseling; *Neurobiology of Aging* 33 (2012) 1847.e15–1847.e21
19. L. Redler Rachel, V. Dokholyan Nikolay, *The Complex Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) ; Progress in Molecular Biology and Translational Science, Vol. 107 , Elsevier 2012.*
20. P J Shaw, Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neuron disease; *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:1046–1057. doi: 10.1136/jnnp.2004.048652
21. Lattante S, Rouleau G a., Kabashi E. TARDBP and FUS Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update. *Hum Mutat.* 2013; 34(6):812-826. doi:10.1002/humu.22319.
22. M.J. Strong, The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis; *Pharmacology & Therapeutics* 98 (2003) 379–414.
23. R.K. Chaturvedi, M.Flint Beal, *Mitochondrial Diseases of the Brain; FreeRadicalBiologyandMedicine*63(2013)1–29
24. M. Cozzolino et al., Mitochondria and ALS: Implications from novel genes and pathways; *Molecular and Cellular Neuroscience* 55 (2013) 44–49.
25. Vela A., et al. Mutación SOD1-N19S en una familia de esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología* (2012) 27(1): 11 – 15.
26. Hui-Ling Xiong, Jin-Yang Wang, Yi-Min Sun, Jian-Jun Wu, Yan Chen, Kai Qiao, Qiao-Juan Zheng, Gui-xian Zhao, Zhi-Ying Wu. (2010). Association between novel TARDBP mutations and Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Medical Genetics*, 11:8
27. J.M. Elía, E. Ibañez, J.C. Valero, et.al., Síndrome del «hombre en barril» (diplejía braquial como variante de esclerosis lateral amiotrófica); *Rehabilitación (Madr)*. 2012; 46(3):236---238

28. Ryuji Kajia, Yishin Izumia, et.al., ALS-Parkinsonism-Dementia complex of Kii and other related diseases in Japan; *Parkinsonism and Related Disorders* 18S1 (2012) S190–S191
29. H. Tomiyama et al., Mutation analysis for DJ-1 in sporadic and familial Parkinsonism: Screening strategy in Parkinsonism; *Neuroscience Letters* 455 (2009) 159–161.
30. P.L. 664 McGeer, J.C. Steele, The ALS/PDC syndrome of Guam: Potential biomarkers for an enigmatic disorder; *Progress in Neurobiology* 95 (2011) 663–669.
31. C. Manno, A. Lipari, et.al., Sporadic Parkinson disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis complex (Brait-Fahn-Schwartz Disease); *Journal of the Neurological Sciences* 326 (2013) 104–106.
32. A., Miguel, Romero., et.al. Guía Clínica de la Enfermedad de Pompe de inicio tardío; *Revista de Neurología, RevNeurol* 2012 54(8): 497-507.
33. K. Kollwe et al., ALSFRS-R score and its ratio: A useful predictor for ALS-progression; *Journal of the Neurological Sciences* 275 (2008) 69–73
34. **Radunović, A**, Et.al, Clinical care of patients with amyotrophic lateral sclerosis; *Lancet Neurol* 2007; 6, Oct: 913–25.