



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS EN LOS EXONES 2, 3 Y 10 DEL
GEN *MAPT* EN PACIENTES CON PROBABLE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER
Y DEMENCIA FRONTOTEMPORAL.**

TESIS

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

PRESENTA

ISAAC NEGRETE RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

VOCAL: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: Profesor: PETRA YESCAS GÓMEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

2° SUPLENTE: Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”.

ASESOR DEL TEMA
DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

SUSTENTANTE:
NEGRETE RODRÍGUEZ ISAAC

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	4
2. RESUMEN	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 El concepto de demencia	8
3.2 Epidemiología	9
3.3 La Enfermedad de Alzheimer	10
3.3.1 Clasificación de la EA	11
3.3.2 Síntomas cognitivos	12
3.3.3 Duración de la enfermedad	12
3.3.4 Diagnóstico clínico y molecular	12
3.3.5 Biomarcadores en sangre periférica	13
3.3.6 Factores de riesgo	14
3.3.7 Género y edad	14
3.3.8 Factores cardiovasculares	14
3.3.9 Educación	15
3.3.10 Estilo de vida y dieta	15
3.3.11 Síndrome de Down	16
3.3.12 Genes causantes de las formas familiares	16
3.3.13 Patología de la EA	17
3.3.14 Hipótesis de la cascada amiloidea	19
3.4 La Demencia Frontotemporal	21
3.4.1 Subtipos de DFT	22
3.4.2 Inclusiones proteicas	23
3.4.3 Duración de la enfermedad	23

3.4.4	Diagnóstico clínico y molecular.	23
3.4.5	Biomarcadores y factores de riesgo.	24
3.4.6	Genes relacionados con la DFT.	25
3.4.7	Patología de la DFT.	26
3.5	Proteína tau y la dinámica de los microtúbulos.	27
3.5.1	Función biológica.	27
3.5.2	Localización neuronal.....	28
3.5.3	Características bioquímicas y estructurales.	28
3.6	El gen <i>MAPT</i> (proteína asociada a microtúbulos tau).....	29
3.6.1	Regiones codificadas por los exones 2 y 3.....	31
3.6.2	Región codificada por el exón 10.	31
3.6.3	Estabilidad neuronal debida a las isoformas de tau.....	33
3.6.4	Regulación de las isoformas de tau.....	33
3.7	Taupatías, presencia de las NFTs.....	34
3.8	Formación de las NFTs.....	35
3.9	Variantes génicas relacionadas con <i>MAPT</i>	36
3.10	El proceso de <i>splicing</i>	38
3.10.1	El <i>spliceosoma</i>	40
3.10.2	Regulación del <i>splicing</i> alternativo.	42
3.10.3	Enfermedades causadas por cambios en el <i>splicing</i> alternativo.....	45
3.11	Mecanismos implicados en el daño neurodegenerativo.	46
3.11.1	Hiperfosforilación de la proteína tau	46
3.11.2	Resistencia a la degradación	48
3.11.3	Desestabilización de los microtúbulos	49
3.11.4	Disfunción energética.....	50

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	51
5. HIPÓTESIS.....	51
6. OBJETIVOS.....	51
7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	52
7.1 Población de estudio.....	52
7.2 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica	54
7.3 Cuantificación del ADN	55
7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	56
7.5 Resolución de los productos de PCR.....	59
7.6 Purificación de los productos de PCR	59
7.7 Reacción de secuenciación.....	61
7.8 Purificación de los productos de secuenciación	62
7.9 Secuenciación automatizada.....	62
7.10 Análisis de las secuencias.....	62
8. RESULTADOS.....	63
8.1 Análisis de los productos de PCR.	63
8.2 Variaciones encontradas	64
9. DISCUSIÓN	75
10. CONCLUSIONES	82
11. PERSPECTIVAS.....	82
12. BIBLIOGRAFÍA	84

1. ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
A β	Péptido β -amiloide
sPPA	Péptido β -amiloide soluble
A β 40	Péptido β -amiloide de 40 aa
A β 42	Péptido β -amiloide de 42 aa
ADN	Ácido Desoxiribonucléico
APNF	Afasia Progresiva No Fluente
APOE	Apolipoproteína E
ARNm	Ácido Ribonucléico mensajero
CaMKII	Proteína cinasa II dependiente de calmodulina (<i>Calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
DCB	Degeneración corticobasal (<i>Corticobasal degeneration</i>)
CK-1	Caseína cinasa 1 (<i>Casein kinase 1</i>)
DFT	Demencia Frontotemporal
DFT-TAU	DFT con inclusiones de TAU.
DFT-TDP	DFT con inclusiones de ubiquitina y TDP
DFT-FUS	DFT con inclusiones de FUS
DFT-VC	DFT Variante Conductual
DLF	Demencia Lobar Frontal
DS	Deterioro Semántico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FUS	Proteína de Fusión a Sarcoma (<i>Fused in Sarcoma</i>)

FPR	Filamentos Pareados Rectos
FPH	Filamentos Helicoidales Pareados
FTDP-17	Demencia Frontotemporal y Parkinsonismo Ligado al Cromosoma 17q (<i>Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17q</i>)
GSK-3	Glucógeno sintasa cinasa-3 (<i>glycogen synthase kinase-3</i>)
HSF	<i>Human splicing finder</i>
hnRNP	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>)
kDa	KiloDalton
KXGS	Dominios conservados de Lisina/Aminoácido/Glicina/Serina
MAPT	Proteína de Asociación a Microtúbulos Tau (<i>Microtubule Associated Protein Tau</i>)
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos (<i>Microtubule associated proteins</i>)
mM	miliMolar
NFTs	Marañas de neurofibrillas (<i>Neurofibrillary Tangles</i>)
μL	Microlitros
ng	Nanogramos
OMS	Organización Mundial de Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PKA	Proteína cinasa A (<i>Protein kinase A</i>)
PP2A	Proteína fosfatasa 2A (<i>Protein phosphatase 2A</i>)
PP1	Proteína fosfatasa 1 (<i>Protein phosphatase 1</i>)
PGRN	Progranulina
PPA	Proteína Precursora del Amiloide

PSEN 1	Presenilina 1
PSEN 2	Presenilina 2
PSP	Parálisis Supranuclear Progresiva
RPM	Revoluciones por minuto
SA	<i>Splicing</i> alternativo
SC	<i>Splicing</i> constitutivo
SB	Amortiguador de Boratos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>)
SLGR	Solución de Lisis de Glóbulos Rojos
UBAP1	Proteína Asociada a Ubicuitina 1
UPS	Sistema de Ubicuitina-Proteasoma (<i>Ubiquitin Proteasome system</i>)
3R	Tres repetidos
4R	Cuatro repetidos

2. RESUMEN.

La enfermedad de Alzheimer (EA) y la demencia frontotemporal (DFT) son las principales causas de demencia a nivel mundial. Se propone que ambas enfermedades son debidas a la interacción de factores ambientales y genéticos, la EA y DFT forman parte de las “taupatías” debido a la presencia de agregados extracelulares constituidos por la proteína tau en estado hiperfosforilado.

El gen *MAPT* (*proteína asociada a microtúbulos tau*) se ubica en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.3) y codifica para la proteína tau. Está conformado por 15 exones y por *splicing* alternativo en los exones 2, 3 y 10 se producen 6 isoformas de tau (en el cerebro adulto) las cuales se han relacionado con procesos neuronales tales como el ensamblaje de tubulina dentro de los microtúbulos, la polaridad celular neuronal, el crecimiento axonal y su importante interacción con componentes de la membrana plasmática neuronal, filamentos de actina e inclusive las mitocondrias.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar posibles mutaciones y/o polimorfismos en los exones 2, 3 y 10 que participan en el *splicing* alternativo del gen *MAPT* y también se incluyeron los exones 1 y 8. El análisis de los exones se realizó por secuenciación tipo Sanger y posterior evaluación bioinformática. Se identificaron 4 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) previamente reportados en los exones 1, 2, 3 y 8: el rs17650901, rs75242405, rs1800547 y rs62063845 respectivamente. El análisis bioinformático empleando el programa *Human Splicing Finder* predice que el SNP rs17650901 genera un nuevo sitio aceptor de *splicing* y el SNP rs75242405 un nuevo sitio potenciador exónico de *splicing*, ambos cambios podrían dar como resultado isoformas alteradas de la proteína tau, finalmente, los SNP rs1800547 y rs62063845 (cambio sinónimo para treonina) aparentemente no alteran el *splicing* de los exones 3 y 8. Actualmente se sabe que los SNP pueden afectar diferentes procesos como el *splicing* o la síntesis de proteínas, los SNP encontrados podrían relacionarse con la neurodegeneración presente en la EA y DFT.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1 El concepto de demencia.

La demencia se puede definir de acuerdo a los criterios del DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*; manual elaborado por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría, el cual comprende un conjunto de criterios clínicos para diagnosticar diversos trastornos mentales) como un síndrome clínico que implica deterioro cognitivo respecto a un nivel previo que conlleva a la alteración de las capacidades funcionales del sujeto, lo suficiente como para interferir con sus actividades sociolaborales de la vida diaria (Barquero & Payno, 2007).

La pérdida de memoria no es el único síntoma de la demencia ya que otras funciones cerebrales pueden estar disminuidas como las habilidades de lenguaje, las habilidades cognitivas como la capacidad para razonar y resolver problemas, la percepción visual, la capacidad para concentrarse y prestar atención son algunas de las más comunes (National Institutes of Health, 2013).

Existe un amplio espectro de causas por las cuales una persona puede desarrollar deterioro cognitivo y progresar a una demencia: en primer lugar, se tienen los casos debidos a alteraciones neurodegenerativas, este tipo de casos son progresivos e irreversibles, en segundo lugar, diversos factores (descritos en la Tabla 1) también pueden propiciar deterioro cognitivo y no necesariamente se relacionan con alteraciones cerebrales; dichas causas se engloban en un grupo de eventos “reversibles” ya que con el tratamiento adecuado se puede detener la progresión de la enfermedad.

En la Tabla 1 se describen algunos de los principales tipos de demencia conocidos así como los diversos factores que pueden propiciarla:

Tabla 1. Enfermedades y factores etiológicos causantes de demencia.

Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia	Factores etiológicos
Enfermedad de Alzheimer	Depresión.
Demencia vascular	Deficiencia de vitamina B ₁₂ .
Enfermedad de Parkinson	Alcoholismo crónico.
Degeneración lobar frontotemporal, incluyendo: <i>Demencia Frontotemporal</i> <i>Demencia Frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17q</i> <i>Enfermedad de Pick</i> <i>Parálisis supranuclear progresiva</i> <i>Degeneración corticobasal</i>	Ciertos tumores o infecciones en el cerebro. Desbalances metabólicos en tiroides, riñón o hígado.

(Tomado y modificado de Alzheimer's Association, 2014).

3.2 Epidemiología.

La demencia es la enfermedad más común en el adulto mayor: en el año 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó en diversas regiones del mundo un estudio epidemiológico sobre la prevalencia de las personas afectadas por esta enfermedad, dicho estudio abarcó países de ingresos altos (Australia, Canadá, Suecia, Reino Unido entre otros), medianos y bajos (países pertenecientes al sur y este de África) con poblaciones grandes y pequeñas, logrando así estimar que la tasa de morbilidad fue de aproximadamente 35.6 millones de personas afectadas, de las cuales un 58% vivían en países de ingresos bajos y medios.

Cada año se registran alrededor de 7.7 millones de nuevos casos y se ha calculado que entre un 2% y 8% de la población general de 60 años o más sufre este padecimiento en un momento determinado de su vida, de acuerdo con las estadísticas, la población afectada casi se habrá duplicado para el año 2030 teniendo aproximadamente 65.7 millones de afectados y triplicado con 115.4 millones para el año 2050 (OMS, 2013) como se muestra en la Figura 1:

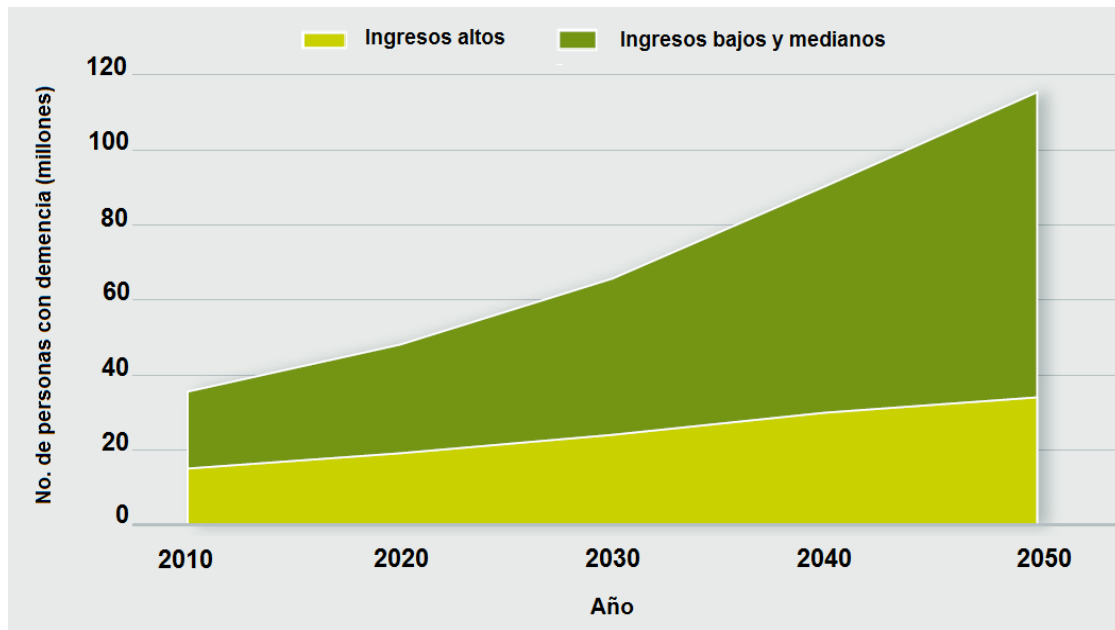


Figura 1. Número de personas que padecen demencia (EA, DFT, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, etc.) a nivel mundial. Según diversas estimaciones, la tasa de morbilidad para personas con demencia aumentará drásticamente durante los próximos años. (Tomado y modificado de OMS, 2013).

3.3 La enfermedad de Alzheimer.

En el año de 1906 el Dr. Alois Alzheimer, neurólogo y psiquiatra alemán describió el caso de una mujer de 51 años con un cuadro de síntomas poco comunes que incluían pérdida de memoria, problemas de lenguaje, comportamiento, desorientación y alucinaciones, tras la muerte de la paciente se realizó la autopsia del cerebro donde se observaron dos lesiones particulares debidas a agregados proteicos que ahora se conocen como placas amiloideas y marañas de neurofibrillas (NFTs) (Pooler y cols, 2013; Rodgers, 2005).

Hoy en día se sabe que la EA es la principal causa de demencia en el adulto mayor a nivel mundial y que es un padecimiento neurodegenerativo, progresivo e irreversible caracterizado por la alteración de áreas que controlan el pensamiento, el lenguaje y eventualmente la memoria hasta llegar a su pérdida total, así como disfunciones en otros dominios cognitivos que intervienen con el estado de ánimo, razonamiento y el juicio (Rodgers, 2005).

En la Figura 2 se muestra una representación de la evolución de la EA y algunas de las alteraciones que se presentan durante la misma:

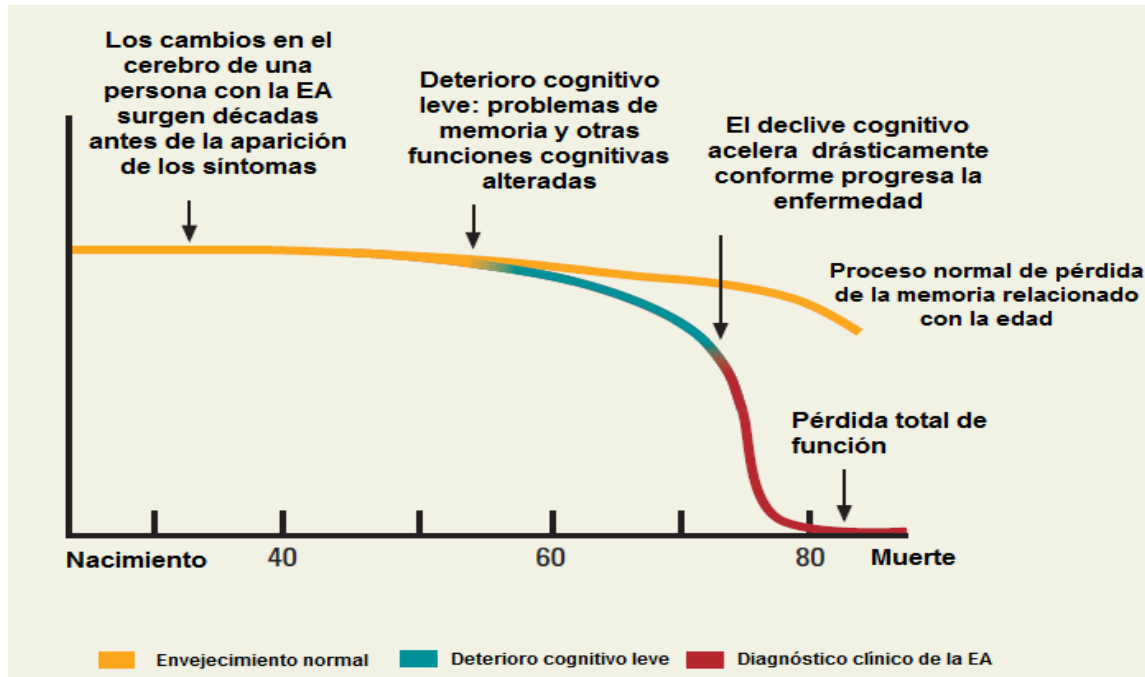


Figura 2. Gráfica que representa la evolución cognitiva de una persona sana y una persona que cursa con la EA. Diversos procesos ocurren en el cerebro a lo largo de los años, procesos graduales que resultan de la combinación de factores biológicos, genéticos, ambientales, el estilo de vida entre otros; se sabe que una persona que cursa con la EA tiende a un declive cognitivo más drástico que una persona no afectada por la enfermedad y que envejece normalmente. (Tomado y modificado de Rodgers, 2005).

3.3.1 Clasificación de la EA.

La EA se puede clasificar con base en la edad de presentación de la misma, teniendo casos de inicio temprano cuando la enfermedad se presenta antes de los 65 años de edad y de inicio tardío cuando ésta se presenta después de los 65 años (Alonso y cols, 2012), cabe mencionar que la forma más común de la EA suele ser de inicio tardío ya que constituye aproximadamente el 95% de los casos totales y que la prevalencia de la EA se duplica cada intervalo de 5 años después de los 65 años de edad (Barquero & Payno, 2007).

La otra clasificación se basa en la presencia de antecedentes familiares, los cuales pueden definir un patrón de herencia, mientras que los casos que carecen de antecedentes familiares se consideran “esporádicos” y constituyen aproximadamente el 90% del total de casos. Los casos esporádicos han sido asociados predominantemente con el estrés oxidativo y otros eventos celulares (LaFerla & Oddo, 2005) como la disminución en la expresión de proteínas relacionadas con la fusión y fisión mitocondrial (Hroudová, Singh & Fišar, 2014).

3.3.2 Síntomas cognitivos.

Los síntomas más comunes implican el deterioro de la habilidad para recordar nueva información, problemas para comprender imágenes visuales, problemas en el habla, la escritura, cambios en el estado de ánimo y la personalidad, incluyendo apatía y depresión (Alzheimer’s Association, 2014). Los síntomas también se relacionan con la alteración de los niveles plasmáticos de neurotransmisores como la acetilcolina y la serotonina (Herrera & Hernández, 2010).

3.3.3 Duración de la enfermedad.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, el progreso y duración de la enfermedad es muy variable: la evolución media de la enfermedad desde el inicio de la sintomatología abarca un intervalo de 8 a 12 años (Barquero & Payno, 2007). Por ejemplo, en un estudio realizado en 2002 (Brookmeyer y cols, 2002) se observó que el tiempo de supervivencia fue de 8.3 años para personas diagnosticadas con la EA a la edad de 65 años y un promedio de 3.4 años para personas diagnosticadas a los 90 años (Zanetti, Solerte & Cantoni, 2009).

3.3.4 Diagnóstico clínico y molecular.

Para poder efectuar el diagnóstico clínico de la EA se requieren descartar otros factores causantes del cuadro clínico como infecciones, deficiencia vitamínica, problemas tiroideos, tumores cerebrales, efectos secundarios de algunos fármacos y la depresión, son algunas de las causas más comunes, además de evaluar la memoria y habilidades cognitivas del paciente (Herrera & Hernández,

2010). Por lo que el diagnóstico clínico se basa en el análisis de la historia clínica del paciente así como la aplicación de diversos exámenes físicos, neurológicos, psiquiátricos, psicológicos, pruebas de laboratorio y de imagen.

El diagnóstico molecular se enfoca en las formas familiares de la EA y en ellas han sido descritas mutaciones en los genes de Presenilina 1 (*PSEN 1*), Presenilina 2 (*PSEN2*) y el gen que codifica para la Proteína Precursora Amiloide (*PPA*); las mutaciones en estos genes promueven la generación del péptido β -amiloide de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) el cual forma las placas amiloideas presentes en los pacientes con EA.

No obstante, el diagnóstico definitivo de este padecimiento solo se puede confirmar histopatológicamente mediante el análisis post mortem del cerebro del paciente; donde se determina la presencia o ausencia de las lesiones características de la enfermedad: las NFTs y las placas amiloideas.

3.3.5 Biomarcadores en sangre periférica.

Las personas que tienen un mayor riesgo de padecer la EA son aquellas que presentan evidencia de las lesiones que se relacionen con la enfermedad y que pueden ser detectadas mediante estudios de neuroimagen y alteración de algunos marcadores específicos en líquido cefalorraquídeo o plasma como la presencia del $A\beta_{42}$ o la proteína tau hiperfosforilada (Viadero, Rodríguez & Combarros, 2013) teniendo valores aumentados con respecto a individuos no afectados por la enfermedad.

Se ha propuesto que niveles elevados del $A\beta_{42}$ y niveles bajos de $A\beta_{40}$ en plasma de personas mayores indican una conversión de la normalidad cognitiva a un deterioro cognitivo leve relacionado con el inicio de la EA.

3.3.6 Factores de riesgo.

Hasta la fecha, la etiología de la EA aún es desconocida, sin embargo, existen algunas teorías para poder explicar el por qué se presentan los diferentes eventos patológicos de esta enfermedad, donde se tiene evidencia de la asociación de factores genéticos. En diversos reportes se describen factores de riesgo (no necesariamente genéticos y que se denotan como “modificables”, entre ellos la alimentación, el estilo de vida y la educación) que también se relacionan con la enfermedad y su desarrollo (Barquero & Payno, 2007).

A continuación se describen brevemente algunos de los factores de riesgo más importantes con los que se relaciona la EA:

3.3.7 Género y edad. La edad misma actúa como un factor de riesgo en la EA; diversos cambios relacionados con la edad pueden dañar al cerebro y predisponer a las personas de edad avanzada a padecer demencia, un ejemplo claro es el estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres y a la disfunción mitocondrial, otro ejemplo se relaciona con la reducción en los niveles del factor de crecimiento nervioso y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BNDF) (Rodgers, 2005) que es una proteína esencial para el crecimiento y diferenciación neuronal.

Con respecto al género se ha encontrado que la incidencia es mayor en mujeres que en hombres (Alberca y cols, 2002) conforme avanza la edad; se considera que las mujeres entre 70 y 79 años tienen una prevalencia promedio de demencia de 5.22% y de 19.68% para mujeres de más de 80 años comparado con valores de 2.60% y 16.8% respectivamente para los hombres (Erol, Brooker & Peel, 2015).

3.3.8 Factores cardiovasculares. Existe evidencia que sugiere que la fisiología normal del cerebro está estrechamente ligada con el adecuado funcionamiento del sistema circulatorio, de este modo, las enfermedades cardiovasculares han sido asociadas con el desarrollo de la EA y otras demencias. Entre los factores que

afectan el sistema cardiovascular se encuentra el hábito de fumar, la obesidad, la predisposición a la diabetes, el colesterol elevado y la hipertensión (Alzheimer's Association, 2014).

3.3.9 Educación. Usualmente las personas que cursan con alguna alteración neurodegenerativa y que poseen un alto nivel educativo (término denominado reserva cognitiva) aparentemente muestran un retraso en el inicio de la demencia comparado con personas afectadas que tienen un bajo nivel educativo (Zanetti, Solerte & Cantoni, 2009).

El concepto de reserva cognitiva surge a partir del estudio de diferentes tipos de demencias y se define como la capacidad de “activación” de diferentes redes neuronales en respuesta al deterioro neurológico (muerte neuronal). Algunos investigadores afirman que el hecho de tener un cierto número de años de educación construye la llamada “reserva cognitiva”, la cual permite a los individuos tener una mejor compensación o hacer más lenta la progresión de los síntomas en la EA o en cualquier otro tipo de demencia (Alzheimer's Association, 2014).

3.3.10 Estilo de vida y dieta. Diferentes estudios han demostrado que la gente de edad avanzada que practica algún tipo de actividad física cursa con un riesgo reducido para desarrollar deterioro cognitivo y demencia. Se cree que el ejercicio tiene efectos positivos sobre la función cognitiva especialmente con habilidades relacionadas con la planeación, organización y toma de decisiones (Rodgers, 2005).

Otro factor con el cual se ha relacionado la EA es la dieta; algunos estudios epidemiológicos han encontrado que la ingesta de vegetales, pescado y otros alimentos también disminuye el riesgo para desarrollar deterioro cognitivo, probablemente por el gran contenido de antioxidantes, folato y ácidos grasos omega-3 presentes.

3.3.11 Síndrome de Down. Se propone una relación entre el síndrome de Down y la EA ya que algunos reportes demuestran que las personas con síndrome de Down después de sobrevivir 35 años desarrollan las mismas lesiones: placas y marañas presentes en los cerebros de los pacientes con la EA, se cree que esto se debe a la sobreexpresión del gen que codifica para la PPA (ubicado en el cromosoma 21) teniendo como consecuencia la sobreproducción del A β ya que estos pacientes son trisómicos para dicho gen (Barquero & Payno, 2007; Bird, 2010).

3.3.12 Genes causantes de las formas familiares.

Desde el punto de vista genético, la EA es una enfermedad monogénica de tipo autosómico dominante con una penetrancia completa; el grupo de pacientes que engloba las formas familiares es muy reducido ya que puede representar un porcentaje menor al 1% de los casos totales (Alzheimer's Association, 2014; Viadero, Rodríguez & Combarros, 2013).

Hasta la fecha se tienen identificados tres genes que contribuyen a la aparición de las formas familiares: los genes de *PSEN 1*, *PSEN2* y el gen de la PPA. Se sabe también que polimorfismos en el gen de la Apolipoproteína E (*APOE*) participan como uno de los principales factores de riesgo genéticos para el desarrollo de la enfermedad ya que contribuye en un 20% de los casos esporádicos y el riesgo depende de la presencia del alelo $\epsilon 4$. El riesgo aumenta 4 veces en individuos con una copia del alelo $\epsilon 4$ y es de 6 a 8 veces mayor cuando se tienen dos copias, asimismo, se tiene evidencia de que el alelo $\epsilon 2$ de *APOE* puede tener un efecto protector y disminuir el riesgo de padecer la EA, sin embargo su frecuencia es muy baja (Bird, 2010).

En la Tabla 2 se resumen algunas de las características más importantes de los genes mencionados hasta el momento:

Tabla 2. Genes relacionados con la Enfermedad de Alzheimer.

GEN	LOCUS	PROTEÍNA	HERENCIA	CONTRIBUCIÓN A LAS FORMAS HEREDITARIAS
PPA	21q21.2	Proteína Precursora Amiloide	Autosómico dominante	≤5%
PSEN1	14q24.3	Presenilina-1	Autosómico dominante	~80%
PSEN2	1q42.13	Presenilina-2	Autosómico dominante	~5%
APOE	19q13.2	Apolipoproteína E	Factor de riesgo	Factor de riesgo

(Tomado y modificado de Alonso y cols, 2012 y Karch, Cruchaga & Goate, 2014).

Además de lo anterior, estudios recientes han establecido una fuerte asociación genética entre el locus de *MAPT* y algunas enfermedades neurodegenerativas entre ellas la EA; la arquitectura genómica *MAPT* incluye una región de aproximadamente 1.8 Mb de desequilibrio de ligamiento caracterizado por dos haplotipos principales: H1 y H2 que son regiones definidas por numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Caffrey, Joachim, & Martins, 2008).

3.3.13 Patología de la EA.

Una de las principales evidencias histopatológicas que presentan los pacientes con EA es la presencia de placas amiloideas que se depositan extracelularmente en regiones límbicas del cerebro, en el hipocampo, la amígdala y en regiones corticales o subcorticales (LaFerla & Oddo, 2005) y están compuestas por el Aβ42 proveniente de cortes proteolíticos en la estructura de la PPA, este evento involucra a enzimas denominadas secretasas (Stockley & Neill, 2007).

Se denomina vía no amiloidogénica cuando el corte es realizado por una α -secretasa que libera un péptido soluble de 40 aa (sPPA α) no neurotóxico y un fragmento C-terminal de 83aa como se muestra en la Figura 3. Por otro lado, la

vía amiloidogénica implica la intervención de la enzima β -secretasa (perteneciente al complejo BACE) y γ -secretasa, ambas enzimas realizan cortes proteolíticos en la estructura de la proteína, liberando así el A β 42 que se deposita en el espacio extracelular y que tiende a formar agregados (Mattson, 2004).

Un péptido adicional C-terminal de 99aa puede ser internalizado y posteriormente transportado al núcleo donde se asume participa en la expresión de otros genes (incluyendo la inducción de genes apoptóticos).

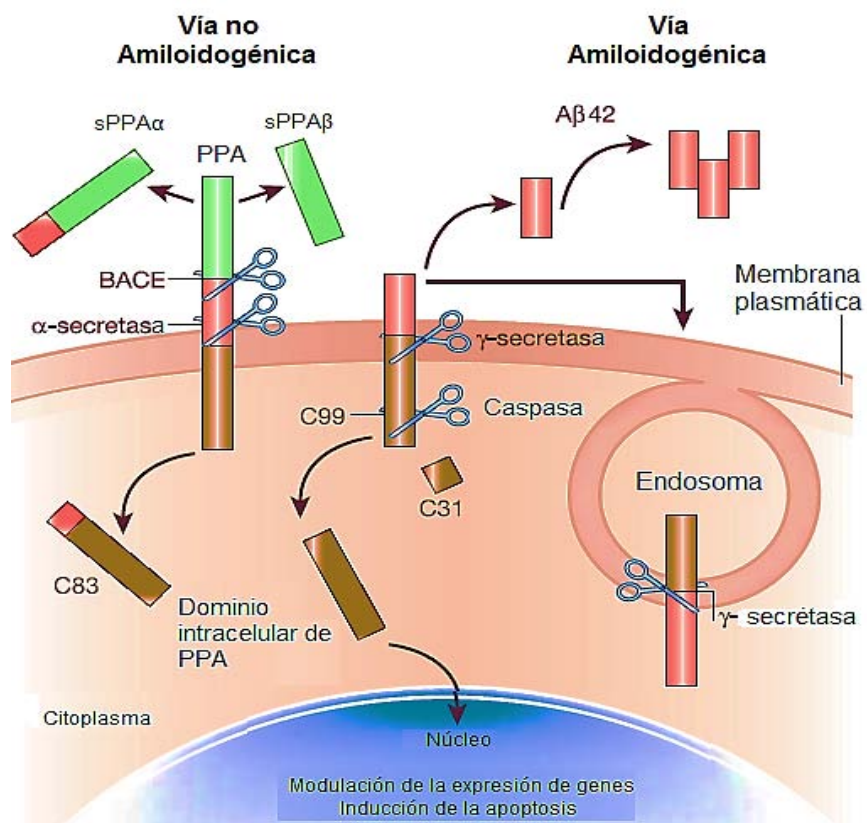


Figura 3. Proceso de generación del A β 40 y el A β 42. La PPA es una proteína integral ampliamente expresada en cerebro y otros tejidos; diferentes péptidos son generados durante su procesamiento, en el cual intervienen enzimas llamadas secretasas (α , β y γ) (Tomado y modificado de Mattson, 2004).

Cabe mencionar que la participación de otras proteínas (incluidas presenilinas) forman parte y son necesarias para que el complejo de la γ -secretasa pueda llevar a cabo su actividad enzimática dentro de la vía amiloidogénica, este complejo se muestra en la Figura 4; Presenilina (PS) es una proteína que posee 8 dominios transmembranales en la que se efectúan cortes proteolíticos formando heterodímeros funcionales, esta proteína posee dos residuos altamente conservados de aspartato (AS, marcados con estrellas rojas) que son indispensables para la actividad de γ -secretasa. Nicastrina es una glicoproteína transmembranal de tipo I que actúa como un cofactor de PS y tiene relación con Aph1, ya que interactúa con Nicastrina formando un intermediario estable en estadios tempranos del ensamblaje del complejo de γ -secretasa, finalmente, PEN-2 regula la endoproteólisis de PS (Mattson, 2004).

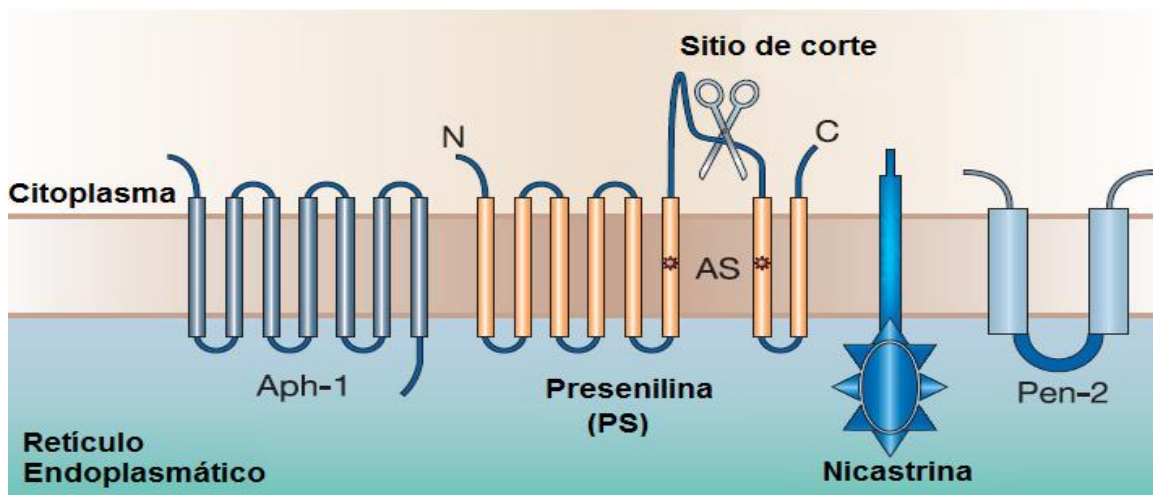


Figura 4. Proteínas involucradas en el complejo γ -secretasa. La actividad de γ -secretasa reside en un complejo de alto peso molecular formado por 4 componentes: presenilina (PS), nicastrina, Aph-1, y el potenciador de presenilina 2 (Pen-2) (Tomado y modificado de Mattson, 2004).

3.3.14 Hipótesis de la cascada amiloidea.

Esta hipótesis postula que las mutaciones en los genes de *PSEN 1*, *PSEN 2* y *PPA* desencadenan la acumulación del $A\beta_{42}$ y una serie de eventos bioquímicos subsiguientes (que se presentan en la EA) tales como la hiperfosforilación de la

proteína tau así como su posterior agregación (Spillantini & Goedert, 2013; LaFerla & Oddo, 2005).

En la Figura 5 se muestra la cascada de eventos que involucra la generación del A β 42: se propone que la interacción del A β 42 con iones como el Fe $^{2+}$ o Cu $^{2+}$ genera peróxido de hidrogeno (H $_2$ O $_2$), molécula que interviene en el proceso de peroxidación de lípidos con la consecuente generación del 4-hidroxinonal (4HNE). 4HNE puede modificar covalentemente las proteínas en residuos de cisteína, lisina e histidina, de esta forma, se asume que la proteína tau puede ser modificada por 4HNE y otras especies reactivas de oxígeno (ERO), promoviendo su agregación e inducir la formación de NFTs (Mattson, 2004).

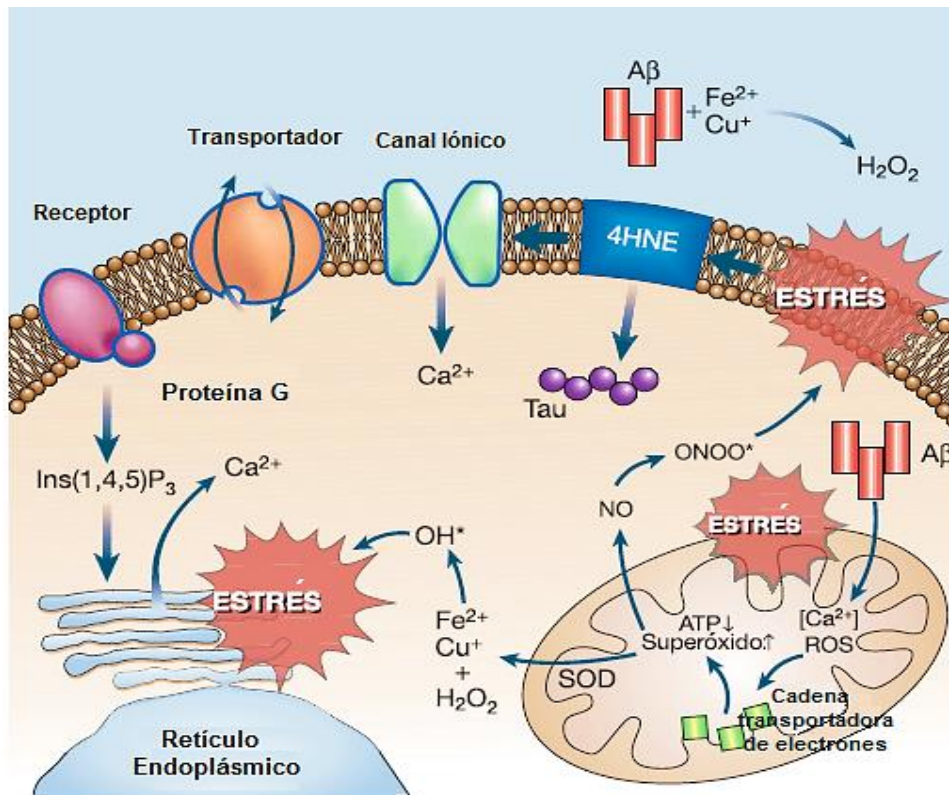


Figura 5. Consecuencias de la generación del A β 42. La acción neurotóxica del A β 42 involucra diversos eventos bioquímicos, entre ellos la generación de ERO, radicales libres y disrupción de la homeostasis celular del calcio (Tomado y modificado de Mattson, 2004).

La otra evidencia histopatológica corresponde a las llamadas NFTs (u ovillos neurofibrilares) compuestas por agregados de la proteína tau hiperfosforilada, estos agregados son la segunda lesión histopatológica que presenta la enfermedad, sin embargo, también se encuentra presente en otros desordenes neurodegenerativos (Götz, Ittner & David, 2005).

Posteriormente se describirán los eventos implicados en esta lesión.

3.4 La Demencia Frontotemporal.

La DFT es la segunda forma más común de demencia a nivel mundial seguido de la EA, se ha estimado que la enfermedad afecta aproximadamente de 15 a 22 individuos por cada 100,000 habitantes de entre 45 y 65 años, comúnmente se describe como un síndrome que es clínicamente y patológicamente distinto de la EA (Chan y cols, 2011; Rohrer & Zetterberg, 2014).

En el año de 1892 Arnold Pick (neuropsiquiatra alemán) estudió el caso de un hombre de 71 años de edad que cursaba con alteraciones en el comportamiento, afasia y demencia (Chan y cols, 2011; Goedert, Ghetti & Spillantini, 2012); dicho estudio se considera como el primer caso reportado y relacionado con la DFT.

Esta enfermedad se caracteriza por cambios en la personalidad, la conducta social con una relativa preservación de la memoria (Roberson, 2006) aunque la aparición de demencia es un evento con el que culmina la DFT, se asocia con la degeneración de la corteza temporal anterior y prefrontal del cerebro y a menudo se asocia con movimientos similares a los vistos en la enfermedad de Parkinson.

La DFT contribuye entre un 5 al 15% de todos los casos de deterioro cognitivo y una historia familiar está presente en un rango del 25 al 50% en el total de casos indicando una fuerte influencia genética en la aparición de la misma (Neumann, Tolnay & Mackenzie, 2009), con respecto al género, afecta tanto a hombres como a mujeres en proporciones similares.

3.4.1 Subtipos de DFT.

La DFT constituye un conjunto de enfermedades neurodegenerativas muy heterogéneo debido a sus características clínicas, histopatológicas y componentes genéticos; esta enfermedad puede presentarse en tres subtipos (que se describen a continuación) cuya característica común es la atrofia de los lóbulos frontales o temporales donde los pacientes muestran deficiencias en los procesos de planeación, juicio, resolución de problemas, organización y atención (Shen y cols, 2013):

DFT - variante conductual (DFT-vc). Es el subtipo más frecuente ya que está presente hasta en el 50 % de los casos de DFT, los pacientes presentan interrupción temprana de la conducta social y personal, daño emocional, pérdida de empatía, apatía, egoísmo, irritabilidad y alteraciones en la conducta alimentaria, pérdida de la conciencia social, en este tipo de variante las alteraciones observadas se dan en los lóbulos frontales (Ostrosky & Gutiérrez, 2012).

Demencia semántica (DS). Contribuye en un 20% del total de los subtipos de DFT y está caracterizada por una afasia fluida con la pérdida o disminución en las habilidades del lenguaje, la atrofia afecta los lóbulos temporales de predominio izquierdo, así como los pacientes que desarrollan agnosia visual con pérdida de la capacidad de reconocer objetos, hechos o palabras presentaran afección del lóbulo temporal derecho (Doherty y cols, 2011).

Afasia Progresiva No Fluente (APNF): Se caracteriza por un deterioro progresivo en la comprensión de las palabras, se presenta agramatismo, apraxia del habla y disartria con conservación de la capacidad de memoria y de razonamiento, mismas que se pierden en etapas tardías con la aparición de demencia. La atrofia es predominante en el lóbulo frontotemporal izquierdo; este subtipo acontece en un 25% de los casos.

3.4.2 Inclusiones proteicas. Histopatológicamente, la DFT también se puede clasificar en función de la presencia de inclusiones proteicas:

DFT-TAU. En este tipo de cuadro clínico se presentan inclusiones de la proteína tau hiperfosforilada tanto en neuronas como células gliales.

DFT-UB. Cerca de un 50% de los pacientes pueden presentar este tipo de alteración y se refieren como DFT-TAU negativos debido a la presencia de inclusiones de ubiquitina.

DFT-TDP. Dentro del grupo anterior (DFT-UB), entre el 80 y 90% de los pacientes presentan inclusiones que están compuestas por la proteína de unión a ADN de 43 kDa (TDP-43).

DFT-FUS. Suelen reportarse casos negativos de TDP-43 pero con inclusiones de la proteína de fusión a sarcoma (FUS) (Xiao-dong & Xiao-chun, 2013).

3.4.3 Duración de la enfermedad.

El inicio de la DFT ocurre comúnmente entre las edades de 45 y 65 años, aunque también puede presentarse antes de los 30 años (afecta predominantemente a pacientes por debajo de los 60 años de edad explicando cerca del 20% del total de casos de DFT), la duración promedio de la enfermedad es de 8 años con un rango de 2 a 20 años (Snowden, Naery & David, 2002; Doherty y cols, 2011).

La evolución de la DFT depende del subtipo clínico presente y de la existencia de alguna otra patología concomitante; se ha observado que los tres subtipos pueden sobrelaparse en un mismo cuadro clínico.

3.4.4 Diagnóstico clínico y molecular.

El diagnóstico clínico debe realizarse como en la mayoría de las enfermedades que cursan con deterioro cognitivo; analizando trastornos de la conducta, síntomas

afectivos, alteraciones del habla, signos físicos (rigidez, temblor, etc.) y de igual forma, se deben realizar pruebas complementarias de neuroimagen que apoyen el diagnóstico.

Diversas características clínicas de la DFT difieren de las presentes en la EA, sin embargo, ambas enfermedades suelen confundirse debido a un solapamiento de síntomas como los cambios en la personalidad, comportamiento y lenguaje del individuo, por lo que en primer lugar se considera a la EA como la posible causa del cuadro clínico y dependiendo de la evolución del paciente se considera a la DFT.

Al igual que en la EA, el diagnóstico post mortem se basa en la presencia de alguna de las inclusiones antes descritas, mientras que el diagnóstico molecular se basa en la búsqueda de variaciones en los genes de *PGRN* y *MAPT* como candidatos principales en pacientes con formas autosómicas dominantes de la DFT-vc, el tamizaje genético para la DS no suele ser útil. Algunas mutaciones en *PGRN* comúnmente son encontradas en formas familiares de APNF (Seelaar y cols, 2008; Seelaar y cols, 2011).

3.4.5 Biomarcadores y factores de riesgo.

Realmente han sido pocos los estudios en los que se evalúan diversos factores de riesgo que pueden causar un cuadro clínico de DFT, se han relacionado algunos de los factores antes mencionados en la EA como las enfermedades cardiovasculares y el traumatismo craneoencefálico. Para el caso de las formas familiares de la DFT se atribuye que alteraciones en diversos genes pueden causar esta enfermedad.

Es útil el análisis de algunos biomarcadores específicos como la concentración sérica de progranulina que se encuentra correlacionada con mutaciones patogénicas en el gen codificante de esta proteína (*PGRN*) (Rohrer & Zetterberg, 2014), por otro lado, estudios de proteómica han revelado que la hormona

adrenocorticotrópica y algunas quimiocinas (interleucinas 23 y 17) pueden ser útiles para diferenciar un cuadro de DFT-TDP de uno DFT-TAU.

Finalmente, han sido asociados algunos SNPs en el gen que codifica la Proteína Asociada a Ubicuitina 1 (*UBAP1*) como un factor de riesgo en la DFT mediante el análisis de expresión de genes y niveles de ARNm (Seelaar y cols, 2011).

3.4.6 Genes relacionados con la DFT.

La genética de la enfermedad es muy heterogénea debido a que se encuentran involucrados diferentes loci con la aparición de la DFT, su localización y contribución con la enfermedad se resumen en la Tabla 3:

Tabla 3. Genes asociados con la aparición de la DFT.

Gen	Localización	Proteína codificante	Relación con la DFT
<i>PGRN</i>	17q21.32	Progranulina	Principal gen asociado con la aparición de la DFT
<i>MAPT</i>	17q21.31	Proteína Asociada a Microtúbulos Tau	Principal gen asociado con la aparición de la DFT
<i>C9orf72</i>	9p21.2	Proteína no categorizada aun	Involucrado en DFT y ELA
<i>TDP-43</i>	1p33.22	Proteína 43 de Unión a ADN TAR	Involucrado en ELA, presunto factor de riesgo para DFT
<i>FUS</i>	16p11.2	Proteína Fusionada a Sarcoma	Generalmente involucrado en ELA y sugerido como factor de riesgo para DFT
<i>VCP</i>	9p13.3	Proteína que contiene Valosina	Relacionado con la enfermedad de Piaget de inicio con cuerpos de inclusión y DFT
<i>CHMP2B</i>	3p11.2	Proteína 2B del Cuerpo Proteico Multivesicular	Presunto factor de riesgo para DFT y ELA

(Tomado y modificado de Shen y cols, 2013).

Alrededor de un 40% de los pacientes afectados con DFT tienen una historia familiar (Xiao-dong & Xiao-chun, 2013) y cerca de un 50% de los casos familiares muestran asociación con el cromosoma 17; variaciones en los genes *MAPT* y *PGRN* están estrechamente ligadas con la aparición de la enfermedad y son las más comunes (Ferrari, Hardy & Momeni, 2011); recientemente el gen *C9ORF72* también se ha sumado como agente causal de la DFT (Goedert, Ghetti, & Spillantini, 2012).

3.4.7 Patología de la DFT.

La patología de la DFT incluye en muchos casos la presencia de las inclusiones proteicas antes descritas, se asume que la interacción de diversos factores, entre ellos la edad y principalmente la predisposición genética pueden promover la aparición del cuadro clínico de la DFT, se considera que las variaciones dentro del gen *MAPT* están estrechamente relacionadas con la patogénesis de la enfermedad.

A finales de los años 90, las primeras mutaciones encontradas en el gen *MAPT* se asociaron con el desarrollo de formas hereditarias de DFT y parkinsonismo ligado al cromosoma 17q (FTDP-17q), esta enfermedad al igual que la DFT se caracteriza por cambios en el comportamiento y déficit cognitivo y la presencia de abundantes filamentos de inclusiones de tau, sin embargo, se diferencia debido a la presencia de alteraciones motoras características de la enfermedad de Parkinson (Wszolek y cols, 2006).

Algunos de los eventos bioquímicos más comunes que se relacionan con la patología de tau incluyen modificaciones postraduccionales en la estructura de la proteína (como la acetilación, glicosilación y principalmente fosforilación), se conoce también que el incremento de cinasas o disminución de fosfatasas y la interrupción en vías de señalización promueven que la proteína tau se agregue formando así las NFTs que son las estructuras características de los casos de DFT-TAU (Wang y cols., 2013).

3.5 Proteína tau y la dinámica de los microtúbulos.

Los microtúbulos conforman una de las principales estructuras del citoesqueleto en las células eucariontes, donde su papel radica en el transporte, motilidad y formación de estructuras celulares primordiales como los axones y el huso mitótico. Los microtúbulos son estructuras semirrígidas y alargadas de origen proteico, con un diámetro de aproximadamente 250 Å compuestos por heterodímeros de α y β tubulina.

Existe una gran familia de Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs), donde todas contribuyen con el proceso de estabilización de microtúbulos a lo largo del organismo, particularmente, tau es una de las principales MAPs que se expresa en el cerebro (Gumucio, Lannfelt & Nilsson, 2013), el papel de cada una de estas proteínas se describe en la Tabla 4:

Tabla 4. Proteínas involucradas en la estabilización de los microtúbulos (MT).

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Ubicación	Función
MAP1	250-300	Dendritas, axones y células no nerviosas	Ensambla y estabiliza MT
MAP2	42 y 200	Dendritas	Ensambla y establece uniones cruzadas entre los MT y filamentos intermedios
MAP4	210	La mayor parte de los tipos celulares	Estabiliza MT
TAU	60-74	Dendritas y axones	Ensambla, estabiliza y establece uniones cruzadas entre los MT
CLIP 170	170	La mayor parte de los tipos celulares	Establece uniones cruzadas entre los MT y cromosomas

(Tomado y modificado de Harvey, 2005).

3.5.1 Función biológica.

La principal función biológica de tau consiste en promover la estabilidad y el ensamblaje de tubulina dentro de los microtúbulos, se sabe que los sitios de fosforilación de tau son fundamentales para su adecuado funcionamiento (Clavaguera, Grueninger & Tolnay, 2014; Pooler y cols, 2013), esta proteína

también se encuentra implicada en diversas vías de señalización e interacción con péptidos como el A β visto en la EA, proteínas como α -sinucleína que está involucrada en la enfermedad de Parkinson, elementos del citoesqueleto e incluso lípidos (Porowska y cols, 2014).

Dentro de las neuronas, tau es esencial para establecer la polaridad celular neuronal, el crecimiento axonal durante el desarrollo celular, el mantenimiento de la morfología, tanto el transporte axonal en neuronas maduras (Feinstein & Wilson, 2005) como el transporte de proteínas (D'Souza & Schellenber, 2005). Del mismo modo, ha sido descrito que la fosforilación de tau permite a las neuronas escapar de la muerte apoptótica a través de la estabilización de beta catenina (Medeiros, Vargas & LaFerla, 2011).

3.5.2 Localización neuronal.

Tau se encuentra presente en distintos estadios de las neuronas en crecimiento y en la membrana plasmática de las mismas (Pooler y cols, 2013), en otras regiones celulares como el núcleo (Andreadis, 2005) , el citoesqueleto, el aparato de Golgi y las mitocondrias en células no neuronales (fibroblastos, linfocitos) (Herrera & Hernández, 2010), así como en diversos tejidos periféricos (corazón, hígado, pulmón, músculo, páncreas y testículos).

3.5.3 Características bioquímicas y estructurales.

La proteína tau es de carácter ácido en el extremo N-terminal y básico en el extremo C-terminal, tiende a ser una proteína hidrofílica y termoestable (Clavaguera, Grueninger, & Tolnay, 2014), diversos estudios estructurales han demostrado que tau es una proteína nativa no plegada que se ensambla en filamentos a través de repetidos en tándem (Spillantini & Goedert, 2013).

En la Figura 6 se muestra como la proteína tau se asocia con los microtúbulos:

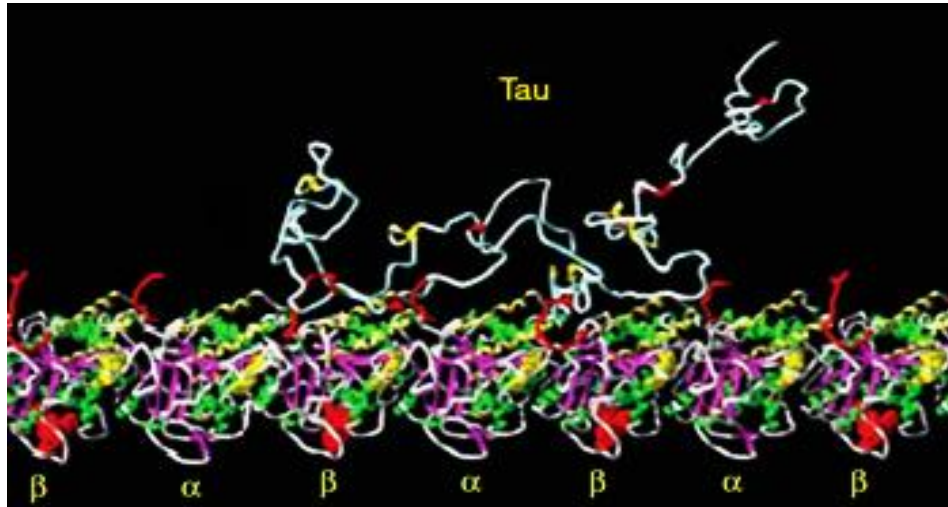


Figura 6. Modelo tridimensional de la proteína tau. Tau es una proteína nativa no plegada que se une a los heterodímeros de α y β tubulina mediante regiones denominadas “repetidos de unión a microtúbulos” ubicadas en el extremo C-terminal de la proteína en cuestión, por otra parte, se ha propuesto que el extremo N-terminal (proyectado hacia la superficie de los microtúbulos) desempeña un papel importante al interactuar con otros componentes del citoesqueleto como la membrana plasmática neuronal. (Tomado y modificado de Mandelkow & Mandelkow, 2012).

3.6 El gen *MAPT* (proteína asociada a microtúbulos tau).

MAPT se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 en la banda 21.31 (17q21.31), su ubicación se muestra en la Figura 7 y está conformado por 15 exones.

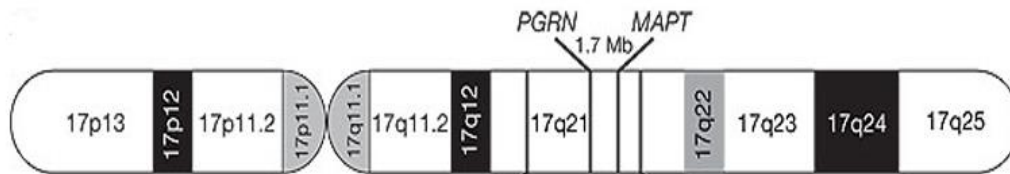


Figura 7. Cromosoma 17. El gen *MAPT* se encuentra ubicado en la región 17q21.31, abarca aproximadamente 150 Kb y está a una distancia de 1.7Mb del gen *PGRN* (Tomado y modificado de Baker y cols, 2006).

El gen *MAPT* codifica para la proteína asociada a microtúbulos tau, produciendo en el sistema nervioso central (SNC) hasta 6 isoformas en un rango de 352 a 441 aa y un PM de entre 36 y 46 kDa, asimismo, existen isoformas adicionales que se

expresan en el sistema nervioso periférico (SNP) y en otros tejidos diferentes al cerebro (Andreadis, 2005; Martin, Latypova, & Terro, 2011).

Específicamente, la estructura primaria de la proteína se divide en tres regiones: una región ácida ubicada en el extremo N-terminal, una región rica en prolinas y una región básica en el extremo C-terminal (Porowska y cols, 2014), cada una de estas regiones es codificada por los exones que componen al gen *MAPT* como se muestra en la Figura 8:

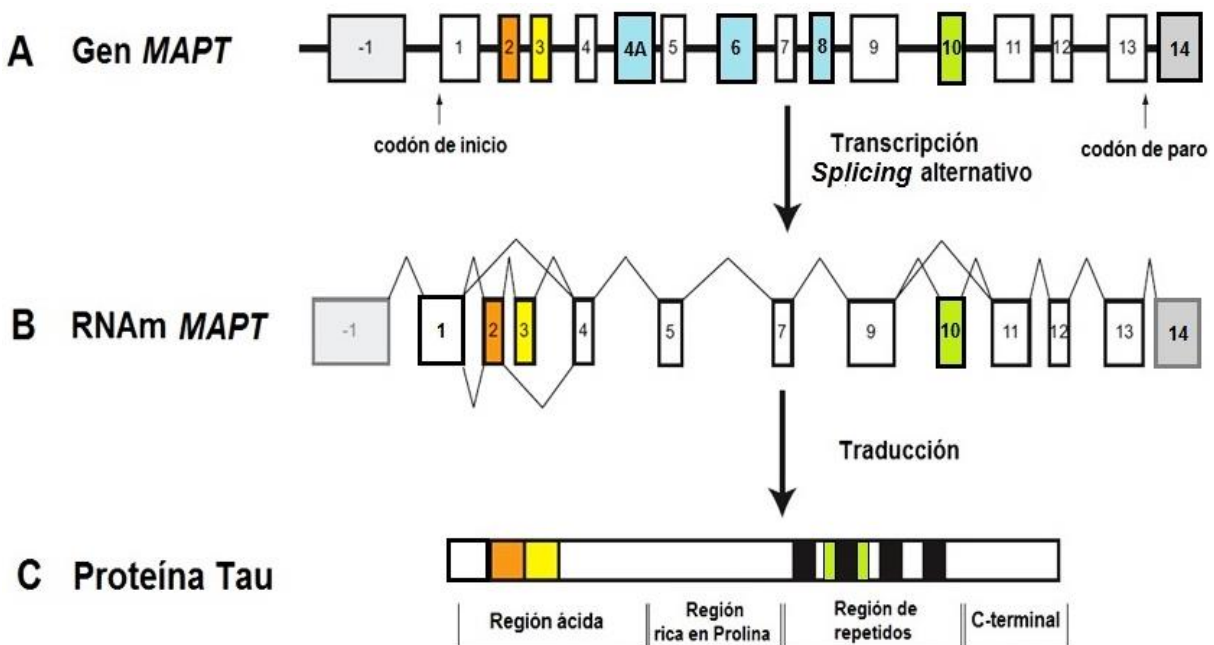


Figura 8. A) Gen *MAPT*. Está compuesto por 15 exones, dentro del SNC los exones 4, 5, 7, 9, 11, 12,13 (en blanco) son constantemente transcritos, mientras que los exones 4A, 6 y 8 (en azul) no lo son pero se expresan en el SNP. **B) ARNm de *MAPT*.** Los exones 2, 3 y 10 son sometidos al proceso de *splicing* alternativo generando hasta 6 isoformas. **C) Estructura primaria de la proteína tau (isoforma de mayor longitud).** La proteína tau está dividida en 4 regiones: una región ácida ubicada dentro del extremo amino terminal, un dominio rico en prolinas, la región responsable de la unión de tau con los microtúbulos conteniendo 4 dominios de repetidos: R1, R3, R4 (en negro) y R2 (en verde), y finalmente el extremo carboxilo terminal. Tau puede contener 3 o 4 dominios de repetidos dependiendo de la presencia (4R) o no (3R) del exón 10, las secuencias de los repetidos terminales son codificadas por los exones 9, 10, 11 y 12 respectivamente. (Tomado y modificado de Gendron & Petrucelli, 2009).

3.6.1 Regiones codificadas por los exones 2 y 3.

Las isoformas de tau que no expresan los exones 2 y 3 (ubicados en el extremo N-terminal de la proteína tau) son llamadas “0N”, por otro lado, las isoformas que expresan solamente el exón 2 son llamadas “1N” y finalmente, las isoformas de tau son llamadas “2N” cuando expresan los exones 2 y 3, cabe mencionar que el exón 3 no se expresa independiente del exón 2 (Qing & Burton, 2011; Caffrey & Wade, 2012; Clavaguera, Grueninger & Tolnay, 2014).

El extremo N-terminal también suele ser denominado “dominio de proyección” ya que se proyecta desde la superficie de los microtúbulos hacia el espacio extracelular, diversos estudios sugieren que el dominio de proyección interacciona con la membrana plasmática neuronal, filamentos de actina y mitocondrias, e inclusive determina el espacio existente entre los microtúbulos y el axón (diámetro axonal) (Kolarova y cols, 2012; Buée y cols, 2000).

3.6.2 Región codificada por el exón 10.

El exón 10 del gen *MAPT* codifica para el segundo de los 4 repetidos de unión a microtúbulos dentro de la estructura de tau (Iqbal y cols, 2009), de este modo, los transcritos que expresan el exón 10 generan 3 proteínas con 4R de unión a microtúbulos y asimismo, los transcritos que no poseen el exón 10 generan 3 proteínas con 3R (Caffrey & Wade, 2012; Qian & Liu, 2014), la longitud de los repetidos es de 30 aa, se ubican en la mitad del extremo C-terminal (Spillantini & Goedert, 2013) y están cargados positivamente, lo cual les permite unirse a los microtúbulos cargados negativamente (Herrera & Hernández, 2010).

Cada dominio de unión contiene un motivo conservado compuesto por la secuencia de aa Lisina/aminoácido/Glicina/Serina (KXGS), se ha descrito que la adición de un grupo fosfato en estos motivos interfiere con la afinidad de tau hacia los microtúbulos. En la Tabla 5 se muestran las características más importantes de las isoformas que se generan a partir del gen *MAPT*:

Tabla 5. Distribución de las isoformas posibles generadas a partir del gen *MAPT*.

Número de aa.	PM (kDa)	# de repetidos	Localización
352	36.7	3R/0N	SNC (isoforma fetal)
381	39.7	3R/1N	SNC
383	40.0	4R/0N	SNC
410	42.6	3R/2N	SNC
412	43.0	4R/1N	SNC
441	45.9	4R/2N	SNC
695*	72.7	4R/2N + 4 ^a	SNP
758**	78.9	4R/2N + 4A y 6	Músculo esquelético

*En esta isoforma se expresa adicionalmente el exón 4A.

**En esta isoforma se expresan adicionalmente los exones 4A y 6.

En la Figura 9 se presenta la estructura primaria de las isoformas de tau generadas debido a la presencia o ausencia de los exones 2, 3 y 10:

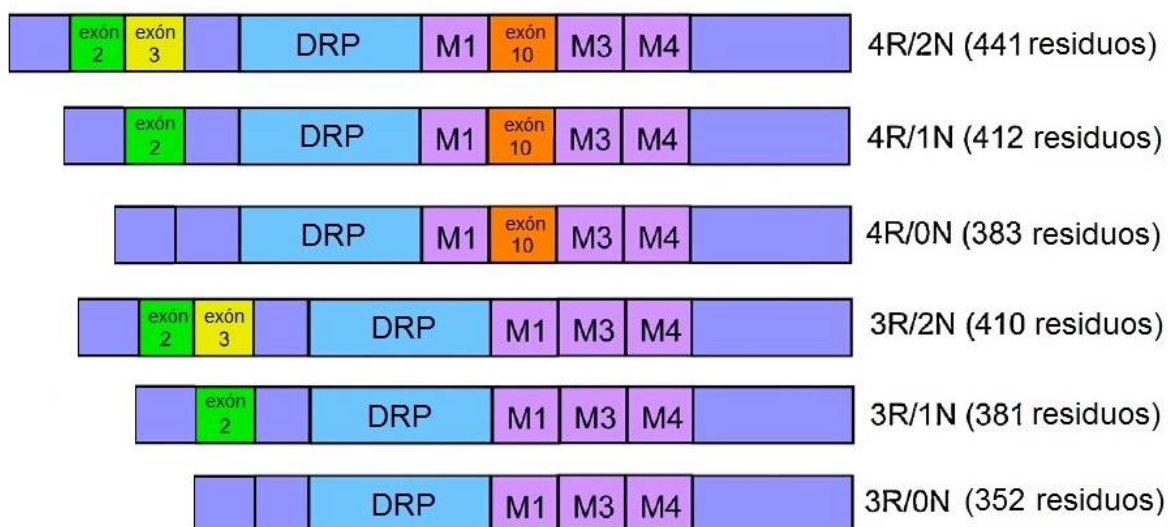


Figura 9. Isoformas generadas en el SNC debido al *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10. Se esquematiza la estructura de las 6 isoformas generadas; los dominios de unión a microtúbulos se encuentran marcados en color morado (M1, M3 y M4), el exón 10 codifica el segundo repetido adicional marcado en color naranja, el exón 3 (marcado en amarillo) nunca se expresa independiente del exón 2 (marcado en verde), DRP (dominio rico en prolina). (Tomado y modificado de Lee, Lee & Rubinsztein, 2013).

3.6.3 Estabilidad neuronal debida a las isoformas de tau.

En el cerebro de un adulto sano se expresan las 6 isoformas de tau y se tiene evidencia de que las isoformas con 4R tienen una mejor promoción del ensamblaje de microtúbulos comparando con las isoformas de tan solo 3R (Spillantini & Goedert, 2013).

El exón 10 que codifica para el segundo repetido de unión a microtúbulos ha sido ampliamente evaluado; numerosos estudios sugieren que dentro de la corteza cerebral de adultos sanos se encuentran cantidades equitativas de las isoformas de tau con 3R y 4R aproximadamente en una relación 1 a 1; sugiriendo así que dicha proporción es esencial para mantener un equilibrio y funciones normales en el cerebro (Spillantini & Goedert, 2013; Gumucio, Lannfelt & Nilsson, 2013).

Las isoformas de tau varían entre especies; por ejemplo, en ratones solo están presentes proteínas tau con 4R (LaFerla & Oddo, 2005), por otro lado, existen situaciones en las cuales la relación de tau puede estar alterada fisiológicamente como lo es durante la embriogénesis (Pittman, Fung & Silva, 2006; Spillantini & Goedert, 2013) en donde la proteína no contiene los exones 2, 3 y 10 (proteína de 352 aa; 0N/3R) (Caffrey & Wade, 2012) y se encuentra en estado hiperfosforilada (D'Souza & Schellenber, 2005).

Otro ejemplo consiste en la hiperfosforilación de la proteína tau en ardillas terrestres, este evento se lleva a cabo durante el proceso de hibernación; se asume que la hiperfosforilación es consecuencia de la disminución en la actividad de la proteína fosfatasa 2A.

3.6.4 Regulación de las isoformas de tau.

La función de tau se encuentra regulada principalmente por dos mecanismos, teniendo en primer lugar el *splicing* alternativo del exón 10 (Qian & Liu, 2014) , la presencia o ausencia de los exones 2 y 3 y en segundo lugar la regulación mediante un balance entre los procesos de fosforilación y desfosforilación (como

se muestra en la Figura 10) en el cual intervienen diversas cinasas y fosfatasas (Feinstein & Wilson, 2005).

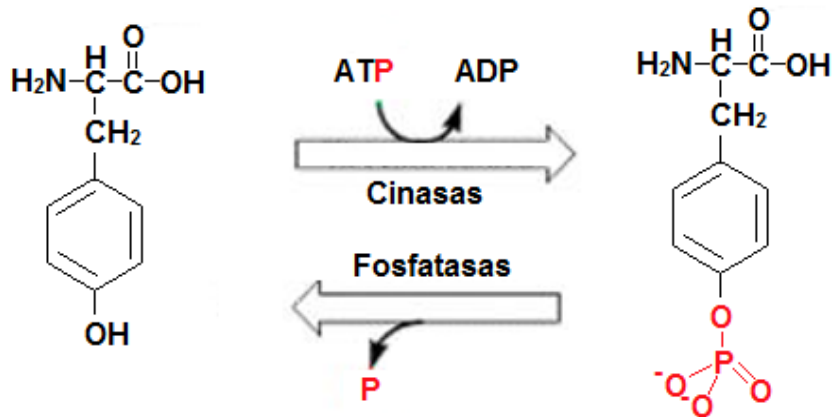


Figura 10. Enzimas involucradas en los procesos de fosforilación/desfosforilación. El proceso de fosforilación se lleva a cabo por la adición de un grupo fosfato mediante una reacción de esterificación en 3 tipos de aa: serina, treonina y tirosina (Martin, Latypova & Terro, 2011), algunos ejemplos de cinasas que actúan en este proceso de regulación son las siguientes: glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3), proteína cinasa A (PKA), proteína Cinasa II dependiente de Calmodulina (CaMKII) y caseína cinasa 1 (CK-1) entre otras. Por otro lado, se tienen a las proteínas fosfatasas 2A y 1 (PP2A y PP1) que participan en el 90% de la actividad de proteínas fosfatasas en residuos de serina y/o treonina en células de mamíferos.

3.7 Taupatías, presencia de las NFTs.

Las estructuras fibrilares referidas como NFTs se encuentran dentro de un grupo heterogéneo de desórdenes neurodegenerativos que se conocen como taupatías (Feinstein & Wilson, 2005), este amplio conjunto de alteraciones incluye formas esporádicas y familiares de la EA, subgrupos de DFT como la FTDP-17, degeneración corticobasal (DCB), parálisis supranuclear progresiva (PSP), la enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, distrofia miotónica, entre otras (Alonso, 2009; López, 2002).

Las taupatías también pueden ser clasificadas en cuanto al tipo de isoformas que componen a las NFTs (es decir isoformas con 3R o 4R), por ejemplo, en la EA y la DFT se encuentran ambos repetidos de tau (3R y 4R) conformando a las NFTs, en

la enfermedad de Pick tan solo se hayan isoformas con 3R y finalmente, en la DCB y la PSP sólo se encuentran isoformas con 4R (LaFerla & Oddo, 2005).

Los diversos mecanismos moleculares, celulares y fisiológicos implicados en el daño neurodegenerativo así como la formación de las lesiones que involucran a la proteína tau aún no son claros, sin embargo, existen diversas teorías que explican estos procesos (Martin, Latypova & Terro, 2011), todas apuntando al hecho de que estos eventos son tan solo una consecuencia de un proceso mucho más complejo.

3.8 Formación de las NFTs.

Se ha propuesto que la interacción entre factores ambientales, genéticos y la alteración de funciones celulares propician la aparición de los agregados proteicos compuestos por tau.

En la Figura 11 se presenta el mecanismo general de formación de las NFTs, dichas estructuras están compuestas por dos tipos de filamentos: los Filamentos Helicoidales Pareados (FPH) y los Filamentos Pareados Rectos (FPR) (Fei, Iqbal, Iqbal, & Gong, 2005) (estos términos hacen referencia a la forma en la cual se conglomeran los filamentos de tau), las NFTs también suelen estar formadas por otras proteínas como MAPT2, ubiquitina y el A β (Xin Gong, Grundke e Iqbal, 2010).

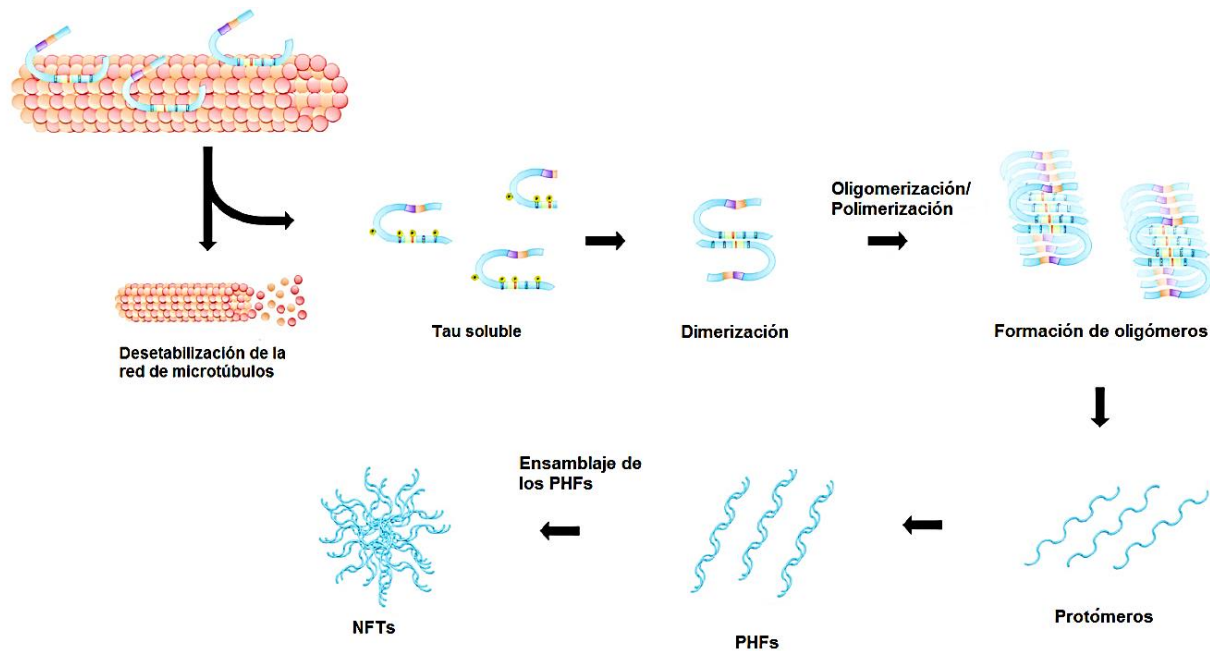


Figura 11. Mecanismo de agregación de tau. Se asume que el desequilibrio en la actividad de cinasas/fosfatasa, mutaciones en el gen *MAPT*, el proceso de hiperfosforilación, la intervención de otras modificaciones postraduccionales e inclusive la interacción con el A β 42 pueden promover cambios conformacionales en la estructura de tau y propiedades de solubilidad alteradas, todos estos cambios tienen como consecuencia la desestabilización de los microtúbulos, evento que favorece la formación de dímeros estables que eventualmente se polimerizan formando oligómeros y subunidades de filamentos llamadas protómeros; 2 protómeros alrededor uno del otro se aglomeran formando los FPH y finalmente las NFTs que se acumulan en compartimientos neuronales. (Tomado y modificado de Martin, Latypova & Terro, 2011).

3.9 Variantes génicas relacionadas con *MAPT*.

Las variantes génicas que se han reportado más frecuentemente en casos de DFT y otras taupatías son las de sitio de *splicing* y recaen principalmente en el exón 10 (<http://www.alzforum.org/mutations/search>, 2015), como su nombre lo indica, estos cambios alteran el proceso de *splicing* alternativo del exón 10, se localizan cerca del sitio donador de *splicing* de dicho exón (o en la secuencia del mismo) y resultan en una sobreproducción de las isoformas con 4R y una producción reducida de las isoformas con 3R (Spillantini & Goedert, 1998).

Sin embargo, también existen otros cambios que alteran la función de la proteína tau, en la Tabla 6 se engloban las variaciones que han sido descritas hasta la fecha:

Tabla 6. Tipo de variaciones descritas en el gen *MAPT*.

Tipo de variación	Efecto	Consecuencias funcionales
Deleciones pequeñas	Delección de codones	Cambios en la relación entre las isoformas de 3R y 4R
Deleciones grandes	Delección completa de exones	Disminución de la función biológica de tau
De sentido erróneo	Cambio de Aminoácidos	Disminución de la función biológica de tau
Sitio de <i>splicing</i>	Alteración del <i>splicing</i> del exón 10	Cambios en la relación entre las isoformas de 3R y 4R

(Tomado y modificado de Ferrari, Hardy & Momeni, 2011).

Otros mecanismos involucrados se consideran para los exones 2 y 3, por ejemplo, se ha propuesto que la relación alterada de isoformas de tau en enfermedades como la PSP pueda ser debida a una disminución de las isoformas que poseen las regiones N-terminales, otros estudios han demostrado que en la DCB ninguna de las isoformas de tau expresa el exón 3 (Caffrey, Joachim & Martins, 2008).

Se cree que existe una relación entre los haplotipos de tau y las regiones codificadas por los exones 2 y 3 (como se mencionó anteriormente, *MAPT* se compone de los haplotipos H1 y H2; el haplotipo H1 se encuentra asociado como un factor de riesgo para el desarrollo de taupatías como la PSP, DCB y la EA) ya que en un estudio realizado en 2005 se observó una sobreexpresión de las isoformas con 2N en cerebros de pacientes con el haplotipo H1/H2 concluyendo que posiblemente la expresión de los exones 2 y 3 (por parte del haplotipo H2) podría contribuir como un mecanismo protector contra las taupatías asociadas con el haplotipo H1 (Caffrey, Joachim & Martins, 2008).

Para el caso de la EA pocos son los cambios reportados en el gen *MAPT* (Brandt, Hundelt, & Shahani, 2005), sin embargo la EA se encuentra relacionada con el haplotipo H1 de tau y los genotipos de *ApoE* siendo un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad y la aparición de las NFTs en la EA puede ser un evento subsecuente de la formación del A β 42 como se había mencionado anteriormente.

Finalmente, la aparición de algunos sitios de fosforilación (debido a cambios de sentido erróneo) se encuentra relacionada con la patología de tau, por ejemplo, en diversos modelos animales se ha comprobado que la aparición de los sitios Ser262 (Iijima, Gatt e Iijima-Ando, 2010) y Ser396 (no presentes normalmente en la estructura de tau) participan en la reducción de la afinidad hacia los microtúbulos.

Debido a que la mayoría de los cambios descritos en *MAPT* tienen como consecuencia aberraciones en el proceso de *splicing* y provocan la alteración de las isoformas de la proteína tau, es de suma importancia conocer los mecanismos implicados el mismo. Cabe mencionar que no solo en las taupatías se pueden encontrar estos cambios, algunos autores han mencionado que aproximadamente el 15% de las mutaciones patogénicas que están ligadas a alguna enfermedad humana causan defectos en el *splicing* (Blencowe, 2000; Baralle, Lucassen, & Buratti, 2009; Cieply & Carstens, 2015).

3.10 El proceso de *splicing*.

La mayoría de los genes humanos que codifican proteínas contienen exones flanqueados por intrones, la remoción de intrones y ligación de exones de un pre-ARNm para producir un ARNm maduro es un paso crucial en la expresión génica, este proceso se denomina *splicing* y es llevado a cabo post-transcripcionalmente (Cieply & Carstens, 2015; Wang & Burge, 2008).

Existen dos tipos principales de *splicing*: el *splicing* constitutivo (SC), que se lleva a cabo mediante la remoción de intrones y ligación de los exones en el orden en el cual aparecen en un gen y el *splicing* alternativo (SA) que es una derivación del tipo anterior con la diferencia de que en este caso ciertos exones son omitidos o saltados resultando en diversos transcritos de ARNm maduros (Wang y cols, 2015). También existen otros patrones de *splicing* tal como se muestran en la Figura 12:

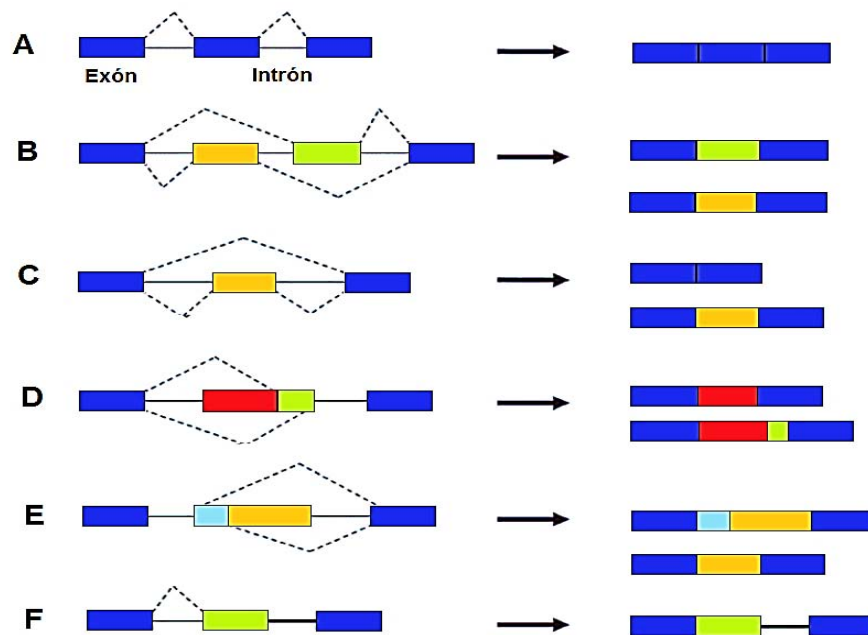


Figura 12. Posibles tipos de *splicing*. **A)** *Splicing* constitutivo. **B)** *Splicing* alternativo, exclusión mutua de exones. **C)** *Splicing* alternativo; salto de exones, este patrón es el más prevalente (~30%) en vertebrados e invertebrados. **D)** *Splicing* alternativo de sitio 3'. **E)** *Splicing* alternativo de sitio 5'. **F)** Retención de intrones; este evento se da principalmente en las regiones UTRs y ha sido asociado con intrones de longitud corta y sitios de *splicing* considerados “débiles”. (Tomado y modificado de Wang y cols, 2015).

El proceso de *splicing* requiere del reconocimiento de secuencias específicas que se encuentran entre las uniones de un exón y un intrón, este conjunto de secuencias se conocen como “señales núcleo de *splicing*” y se muestran en la Figura 13:

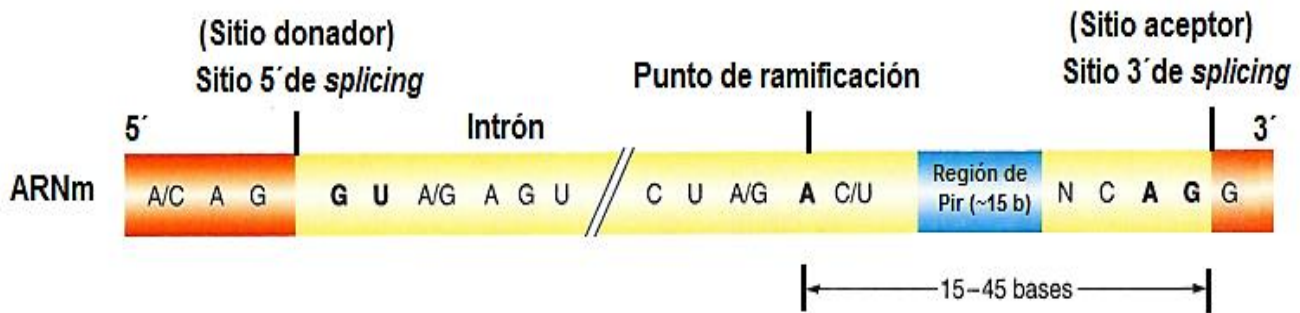


Figura 13. Secuencias consenso reconocidas durante el proceso de *splicing*. Existen tres secuencias consenso específicas que están presentes en cada intrón del ARNm: el **sitio de *splicing* 5'** (conocido como sitio donador de *splicing*) donde se encuentra el dinucleótido Guanina-Uracilo (**GU**), el **sitio de *splicing* 3'** (conocido como sitio aceptor de *splicing*) en el cual está presente el dinucleótido Adenina-Guanina (**AG**) y la secuencia denominada **punto de ramificación** (*branch point sequence*, BPS) que contiene un residuo conservado de Adenosina (A), además se encuentra una región conocida como tracto de polipirimidina (Pir) que se sitúa río arriba del sitio 3' (Cieply & Carstens, 2015). (Tomado y modificado de www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture26.html).

En general, los sitios 5' o 3' que tienen más igualdad a aquellos elementos consenso tienen mayor probabilidad de ser reconocidos por la maquinaria denominada *spliceosoma*, de este modo, las secuencias con mayor o menor igualdad son referidos como sitios fuertes o débiles de *splicing*.

3.10.1 El *spliceosoma*.

La remoción de secuencias intrónicas de un gen para su posterior traducción se efectúa por medio de dos pasos secuenciales de transesterificación catalizados por un complejo proteico denominado "*spliceosoma*". El *spliceosoma* está conformado por ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP; U1, U2, U4/U6 y U5) (Ke & Chasin, 2011) que reconocen las secuencias consenso antes descritas como se muestra en la Figura 14:

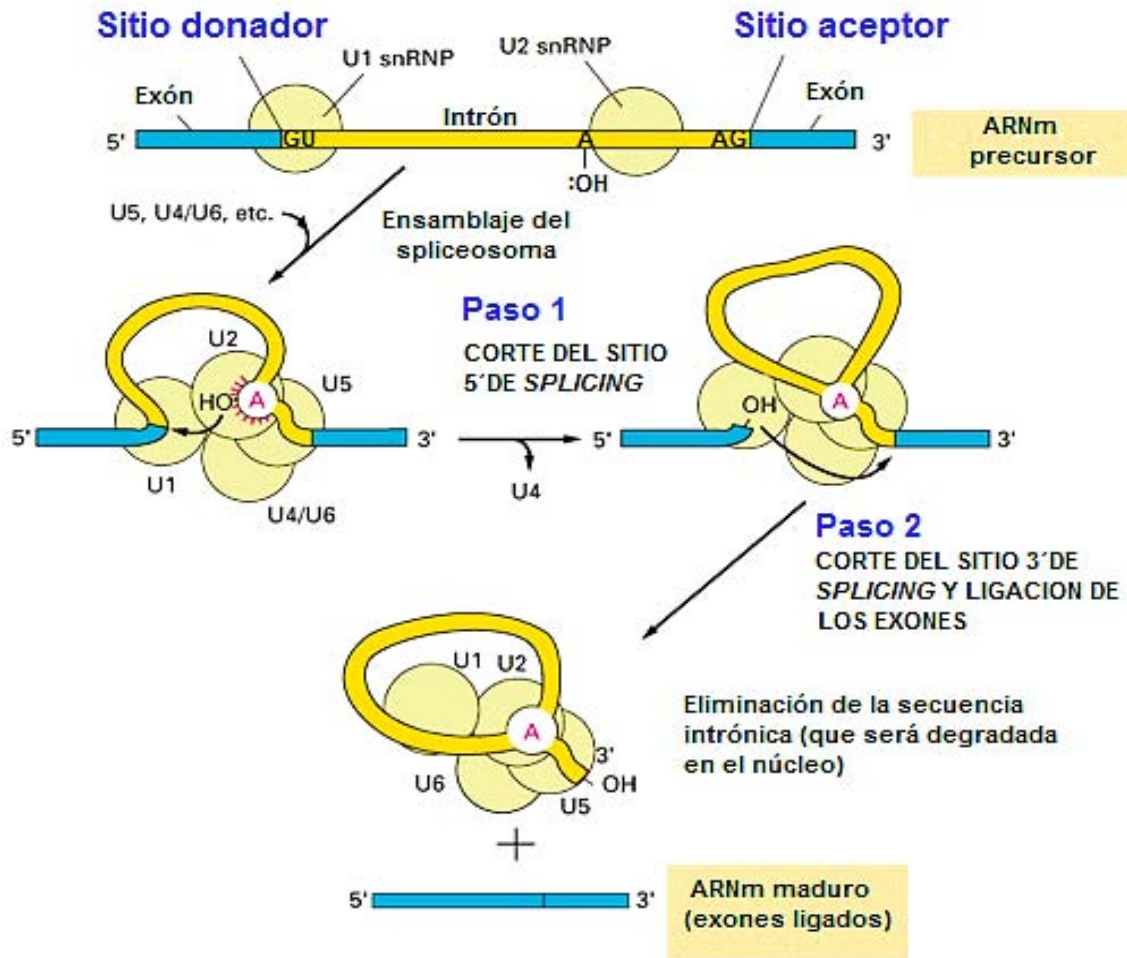


Figura 14. Mecanismo de remoción de secuencias intrónicas debido al *spliceosoma*. El proceso de *splicing* es catalizado por las snRNP **U1, U2, U5 y U4/U6** mediante dos pasos; en el paso 1 la BPS (A) ubicado en la región intrónica (río arriba del sitio 3' de *splicing*) realiza un ataque nucleofílico sobre el sitio 5' de *splicing* (sitio donador) escindiéndolo y formando un intermediario llamado "lazo". En el paso 2, el extremo 3'-OH de la secuencia del primer exón (el cual ha sido originado en el primer paso) se incorpora al extremo 5' de la secuencia del segundo exón (donde se ubica el sitio aceptor) escindiendo el enlace entre la molécula de ARN y el intrón, de este modo, las dos secuencias exónicas se ligan formando el transcrito maduro de ARNm y los intrones en forma de "lazo" son liberados para su posterior degradación. (Tomado y modificado de Alberts y cols., 1994).

El *spliceosoma* también está conformado por otros factores denominados no-snRNP como las proteínas SR, que son proteínas que contienen motivos de reconocimiento de ARN, los cuales determinan la especificidad de unión al ARN y varios dominios (en el extremo C-terminal) ricos en serina y arginina referidos

como dominios RS que se encargan de las interacciones proteína-proteína que son esenciales para el ensamblaje del spliceosoma.

Los transcritos que han sido sometidos al proceso de SA producen isoformas con una amplia variedad de funciones incluidas cambios en la localización subcelular, interacciones proteína-proteína y modificaciones postraduccionales, además, muchos eventos de SA son regulados estrictamente dependiendo del tipo de célula o tejidos específicos durante diferentes estadios de desarrollo (Cieply & Carstens, 2015).

3.10.2 Regulación del *splicing* alternativo.

Se sabe que las señales núcleo no son suficientes para regular el SA, sin embargo, el proceso en cuestión aparentemente se da con una alta fidelidad debido a la presencia de otros elementos específicos involucrados en su regulación.

Los intrones humanos suelen contener numerosos sitios “señuelo” de *splicing* que son secuencias con alta similitud a las secuencias consenso, estos sitios suelen presentarse como “pseudoxones” ya que se parecen a un exón auténtico en términos de tamaño y sitios de *splicing* pero son muy raros y no son transcritos (Wang & Burge, 2008).

De este modo, existen elementos regulatorios de *splicing* denominados “*trans*” que están constituidos por un grupo de proteínas conservadas en eucariontes que incluyen a las proteínas RS (factores positivos que promueven la inclusión de exones durante el SA) y ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) que aparentemente antagonizan la función de las proteínas RS. También existe otro grupo de factores reguladores denominado “*cis*”, que son regiones específicas localizadas en el pre-ARNm y que dependiendo de su localización (exón o intrón) pueden promover o inhibir el *splicing* de un exón en cuestión (Ke & Chasin, 2011), los factores *trans* se unen a los factores *cis*.

A continuación se describe la clasificación de los 4 elementos *cis* existentes y algunas funciones con las cuales se relacionan:

Potenciadores exónicos de *splicing* (ESE). Los ESE se encargan de la inclusión de exones durante los diversos eventos de *splicing* constitutivo y alternativo, se encuentran dentro de la secuencia del exón en cuestión y funcionan reclutando miembros de la familia de proteínas SR, cuya función es en el reconocimiento de ESE llevando a la activación de sitios 3' adyacentes (sitios aceptores).

Silenciadores exónicos de *splicing* (ESS). Son secuencias reguladoras que se encuentran en el exón e interactúan con diversas proteínas para la suprimir inclusión de un exón (por ejemplo las hnRNP); un ejemplo de este mecanismo involucra a PTB (proteína de unión a tracto de polipirimidina; hnRNP clase 1) que puede bloquear esencialmente las interacciones entre las snRNP U1 y U2, cabe mencionar que el papel de las hnRNP radica en la maduración del pre-ARNm y la exclusión de las proteínas SR (Wang y cols, 2015). Los ESE también pueden antagonizar la actividad negativa de las hnRNP reconociendo un ESS.

Potenciadores intrónicos de *splicing* (ISE). Como su nombre lo indica, la función de los ISE consiste en potenciar la inclusión de un exón adyacente, estas secuencias se ubican en los intrones. Los tripletes GGG son secuencias caracterizadas para este tipo de reguladores y pueden potenciar el reconocimiento de sitios adyacentes a los sitios 5' y 3' (sitios donadores y aceptores respectivamente), las secuencias GGG se encuentran comúnmente en los intrones ricos en guanina y citosina y están conservadas en humanos y otras especies como el ratón. Otra secuencia existente es el repetido CA, que en muchos casos puede potenciar el *splicing* de los exones río arriba, se ha descrito que esto probablemente sea a través de la unión de hnRNP L (perteneciente a la familia de hnRNP, hnRNP se localiza en el nucleoplasma).

Silenciadores intrónicos de *splicing* (ISS). Al contrario de los ISE, estos elementos reguladores (que también se encuentran en los intrones) se encargan de suprimir o inhibir la inclusión de exones adyacentes. Existen secuencias tejido específicas que actúan como ISS, por ejemplo, la secuencia YACY (donde Y puede ser citosina o uracilo) que es reconocida por la una proteína llamada “proteína nova” la cual se expresa en neuronas y controla diversos eventos de *splicing* específicos de cerebro, asimismo, existe el motivo UGCAUG que también es reconocido por los factores específicos de cerebro y músculo fox-1 y fox 2.

En la Figura 15 se muestran algunos de los mecanismos de regulación antes descritos:

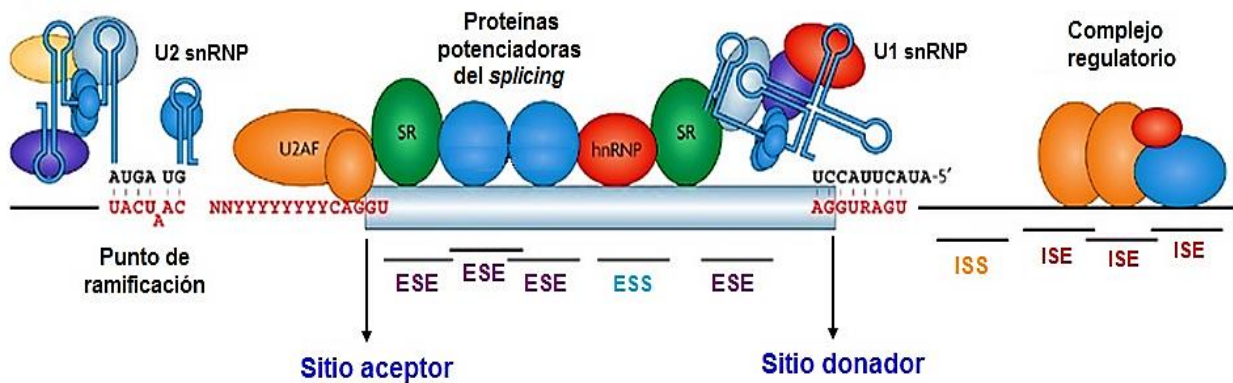


Figura 15. Elementos regulatorios que intervienen en el proceso del SA. Los elementos *cis* se encuentran ya sea en la secuencia del exón o del intrón y son necesarios para el reconocimiento y regulación de la transcripción de un exón alternativo. El sitio donador y la BPS actúan como sitios de unión para los componentes de ARN de las snRNP U1 y U2 respectivamente. Algunos ESE unen proteínas SR, reclutan y estabilizan la unión componentes del spliceosoma como U2AF (factor auxiliar 2F que promueve la inclusión de un exón en el extremo 3'). Los ESS unen componentes proteicos como hnRNP para suprimir el uso de exones, finalmente, algunos ISE unen factores auxiliares que no son asociados normalmente con el spliceosoma para regular el proceso de SA. (Tomado y modificado de Wang & Cooper, 2007).

3.10.3 Enfermedades causadas por cambios en el *splicing* alternativo.

Numerosos estudios han mostrado que diversas mutaciones promueven alteraciones en los sitios de *splicing*, por ejemplo, se sabe que las mutaciones sinónimas en regiones codificantes pueden influenciar la selección del sitio de *splicing*, del mismo modo, se tiene evidencia de que las mutaciones intrónicas e inclusive los SNPs pueden alterar el uso de los exones durante el proceso de SA (Tazi, Bakkour, & Stamm, 2009).

En la Tabla 7 se describen algunos ejemplos claros de enfermedades que se relacionan con alteraciones en sitios reguladores de *splicing*; particularmente de ESE y ESS:

Tabla 7. Mutaciones en enfermedades humanas y función de ESE y ESS.

Enfermedad	Proteína (función afectada)	Localización/tipo de mutación	Defecto en el <i>splicing</i>
FTDP-17	Tau (proteína asociada a microtúbulos; promueve el ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos)	Exón 10/sentido erróneo	Inclusión del exón 10 (constitutivo)
		Exón 10/delección 3nt Exón 10/silenciosa ^a	Exclusión del exón 10 Inclusión del exón 10
Atrofia muscular espinal (SMA)	SMN1: supervivencia de la neurona motora-1 (biogénesis de snRNP)	Exón 7/silenciosa ^b	Exclusión del exón 7
Distrofia muscular de Becker (BMD)	Distrofina (formación de las fibras musculares)	Exón 27/sin sentido ^c	Exclusión del exón 27

^a Se ha propuesto que la mutación silenciosa L284L afecta un elemento adyacente de ESS.

^b Una mutación silenciosa en el codón 280 dentro del exón 7 del gen SMN-1 resulta en la exclusión del exón en cuestión.

^c La mutación sin sentido en el exón 27 del gen de la distrofina está localizado dentro de un elemento rico en purina que funciona como un ESE dentro del contexto del pre-ARNm, la presencia de la mutación sin sentido abate la actividad potenciadora.

(Tomada y modificada de Blencowe, 2000 y Tazi, Bakkour, & Stamm, 2009).

Las mutaciones antes descritas fueron corroboradas en modelos *in vitro* y utilizando herramientas bioinformáticas.

3.11 Mecanismos implicados en el daño neurodegenerativo.

A continuación se describen algunos de los mecanismos más importantes de los cuales se tiene conocimiento y están relacionados con el proceso neurodegenerativo de la proteína tau:

3.11.1 Hiperfosforilación de la proteína tau. El término hiperfosforilación puede ser considerado como un incremento en el número de sitios de fosforilación en una misma molécula de tau y/o un incremento del número de moléculas de tau fosforiladas en un sitio determinado (Martin, Latypova & Terro, 2011); tau normalmente posee de 3 a 5 moles de grupos fosfato por mol de proteína y se ha confirmado que esta relación aumenta drásticamente en una proteína alterada llegando a tener hasta 10 moles de grupos fosfato (Alonso, 2009; Iqbal y cols, 2009). La Figura 16 hace referencia a los diversos sitios de fosforilación que han sido detectados en la estructura de la proteína tau en pacientes con la EA, los cuales se ven alterados durante la progresión de la enfermedad:

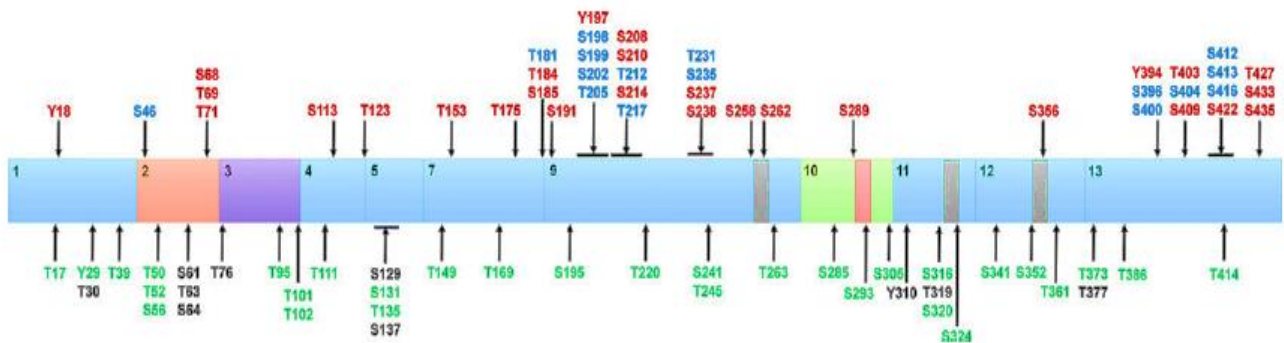


Figura 16. Sitios de fosforilación reportados dentro de la estructura de tau (en función de la isoforma de 441 aa). Se muestran los múltiples sitios que han sido detectados en cerebros de pacientes con la EA (rojo), aquellos sitios encontrados en cerebros de personas normales (verde) y aquellos presentes en ambos casos: en cerebros normales y con EA (azul). Los sitios marcados en negro son presuntos sitios de fosforilación que aún no han sido demostrados mediante estudios *in vitro* o *in vivo*. (Tomado de Martin, Latypova & Terro, 2011).

Los niveles de tau en cerebros de pacientes con EA son de 7 a 10 veces mayores que los encontrados en un cerebro normal, sin embargo, los niveles de ARNm no están aumentados en la EA en comparación con un cerebro normal, esto sugiere que el incremento en los niveles de proteína se debe a la agregación de tau y su resistencia a ser degradada (Alonso, 2009). Hasta la fecha no se conoce que otras modificaciones postraduccionales estén implicadas en la patología de tau, no obstante, se ha corroborado en modelos in-vitro que algunas como la glicosilación, la truncación y la nitración promueven la agregación de tau (Martin, Latypova & Terro, 2011; Mandelkow & Mandelkow, 2012). El uso de anticuerpos monoclonales y técnicas de espectrometría de masas han permitido elucidar la estructura de tau y los diversos sitios modificables que posee (Pooler y cols, 2013) tal y como se muestra en la Figura 17:

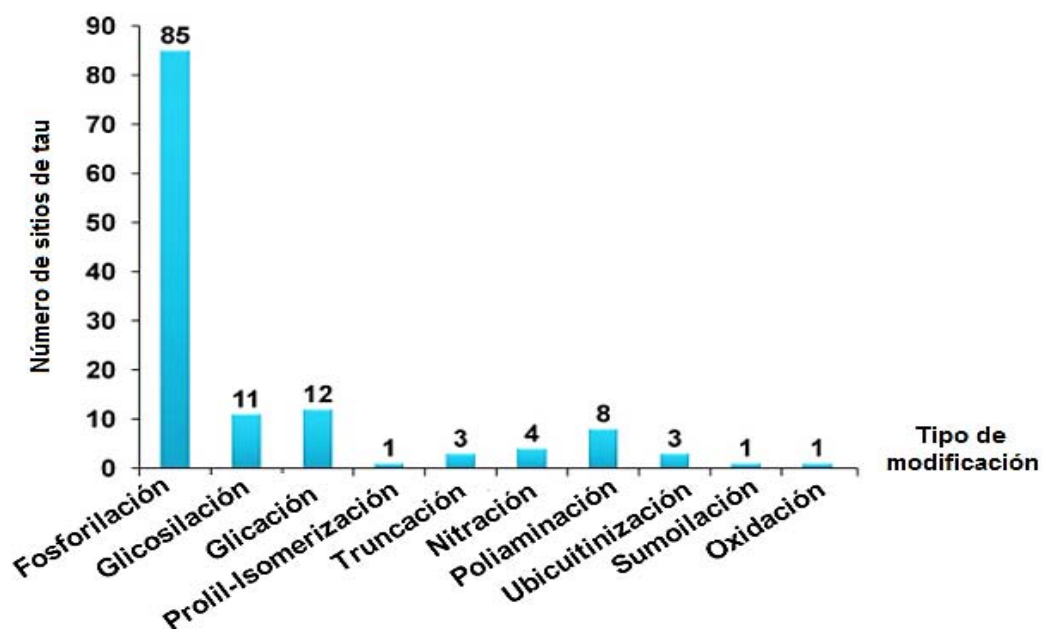


Figura 17. Sitios modificados post-traduccionamente que posee la proteína tau (en función de la isoforma de 441 aa.). Una de las principales modificaciones postraduccionales que adquiere la proteína asociada a microtúbulos tau es la fosforilación (en término del número de sitios involucrados), de los 85 posibles sitios detectados 45 corresponden a residuos de serina, 35 a treonina y 5 para tirosina. En menor proporción, esta proteína es blanco de otras modificaciones como la glicosilación, glicación, prolil – isomerización, truncación, nitración, poliaminación, ubicuitinización y oxidación entre otras. (Tomado y modificado de Martin, Latypova & Terro, 2011).

3.11.2 Resistencia a la degradación. El sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS) y el sistema de autofagia-lisosoma son los principales mecanismos involucrados en la degradación de proteínas intracelulares, proteínas mutantes y proteínas mal plegadas en las células eucariontes. Se sabe que ambos sistemas se encuentran desregulados en la EA y que diversos eventos se llevan a cabo durante la progresión de la enfermedad tal como se observa en la Figura 18; normalmente, la proteína tau es degradada por UPS así como las formas truncadas de tau son depuradas por el sistema de autofagia.

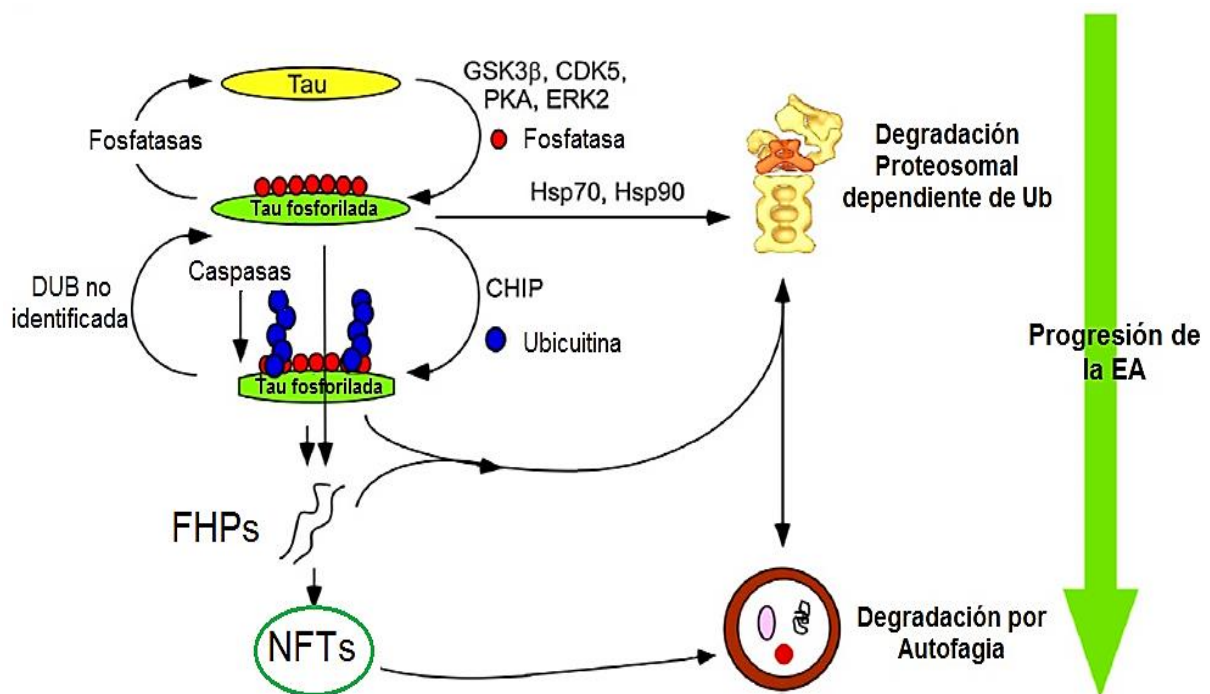


Figura 18. Mecanismos implicados en la degradación de tau vía UPS y autofagia. Diversos eventos acontecen durante la progresión de la EA, en estadios tempranos de la enfermedad tau es degradada vía UPS e interacciona con proteínas de choque térmico que favorecen este proceso, tau fosforilada a su vez puede ser ubiquitinada (proceso normal para mantener la homeostasis celular) para su posterior degradación; no obstante, se asume que en estadios tardíos de la enfermedad los aglomerados de tau no pueden ser degradados debido que estos son inaccesibles a la entrada del proteasoma. (Tomado y modificado de Lee, Lee & Rubinsztein, 2013).

3.11.3 Desestabilización de los microtúbulos. Este proceso involucra dos eventos: la pérdida de función de la proteína en cuestión así como una ganancia de función tóxica, el mecanismo se presenta en la Figura 19. En diversos reportes se concluye que posiblemente tau presenta dos cambios conformacionales durante el proceso de neurodegeneración: en uno tau es capaz de unir tau normal y en el otro tau es capaz de autoensamblarse en filamentos (Alonso, 2009).

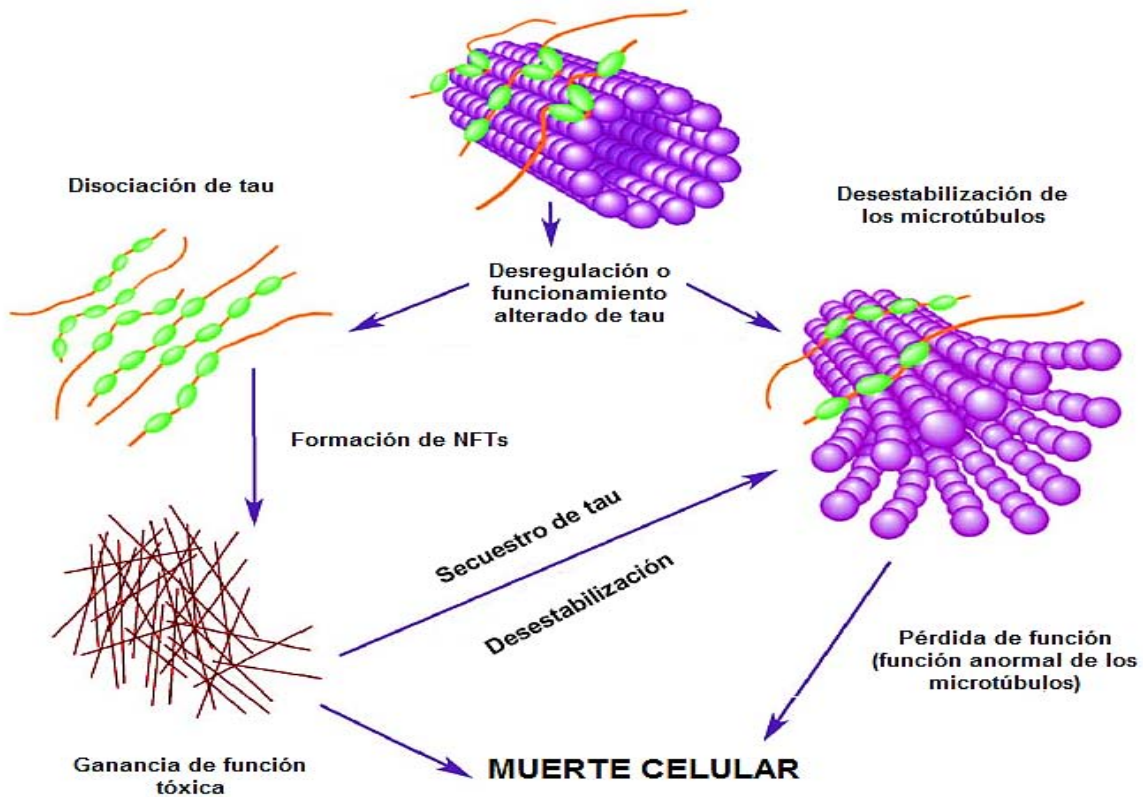


Figura 19. Mecanismos implicados en la desestabilización de los microtúbulos. En primer lugar, se asume que tau adquiere una ganancia de función tóxica debido a variaciones dentro del gen *MAPT* con la posterior formación de las NFTs, como consecuencia adicional, tau regula inadecuadamente la dinámica de los microtúbulos debido a un efecto de dosis/pérdida de función. Se propone que ambos mecanismos actúan en conjunto y que el efecto final es la formación de las NFTs y el secuestro de otras MAPs (particularmente MAP1 y MAP2) inhibiendo su ensamblaje y despolimerizando microtúbulos adyacentes (Wang, Grundke e Iqbal, 2007; Iqbal y cols, 2009), la disrupción de otras funciones celulares incluidas el crecimiento axonal, el transporte en vesículas y organelos y finalmente la propagación de señales nerviosa a través de la red nerviosa formada por los microtúbulos (Martin, Latypova & Terro, 2011).

3.11.4 Disfunción energética. Recientemente ha sido demostrado que los altos niveles de fosforilación promueven otras alteraciones celulares y no solo un impacto sobre la red de los microtúbulos; una disfunción de la respiración mitocondrial, un transporte axonal interrumpido, disfunción post-sináptica y una señalización celular comprometida son tan solo algunos eventos relacionados (Porowska y cols, 2014).

La inhibición del transporte en los microtúbulos disminuye el proceso de exocitosis y afecta la distribución mitocondrial provocando la ausencia de las mitocondrias en las regiones periféricas de los axones y culminando en la disminución del metabolismo de la glucosa y de lípidos, también hay una pérdida en la síntesis de ATP y de la homeostasis del calcio, estos eventos se definen como “muerte reversa” de los axones (Kolarova y cols, 2012).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dada la alta incidencia de casos con EA y DFT a nivel mundial es de suma importancia ampliar el conocimiento relacionado con los mecanismos involucrados en ambos padecimientos. Hasta la fecha se tiene poca información acerca de mutaciones del gen *MAPT* en pacientes con EA (ya que estos casos se han asociado principalmente con mutaciones en genes como *PSEN 1 y 2*, *PPA* y a factores de riesgo como *APOE*); al contrario, en la DFT se han reportado mutaciones que alteran el proceso de corte y empalme o *splicing* alternativo del exón 10, asimismo, los exones 2 y 3 también se encuentran involucrados en este proceso.

En ambos padecimientos es probable que se encuentren mutaciones que afecten la función del gen *MAPT*, por lo que este estudio pretende abordar y analizar la implicación de los exones 2, 3 y 10 de *MAPT* en la EA y la DFT.

5. HIPÓTESIS.

Las mutaciones en los exones 2, 3 y 10 de *MAPT* alterarán los sitios de *splicing* del gen en cuestión y se asociarán a la incidencia de la EA y la DFT.

6. OBJETIVO.

Identificar variantes genéticas en los exones 1, 2, 3, 8 y 10 del gen *MAPT* en pacientes con probable EA y DFT.

7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

La metodología general se explica de forma resumida en el diagrama de la Figura 20, los procedimientos realizados se explican a detalle posteriormente.

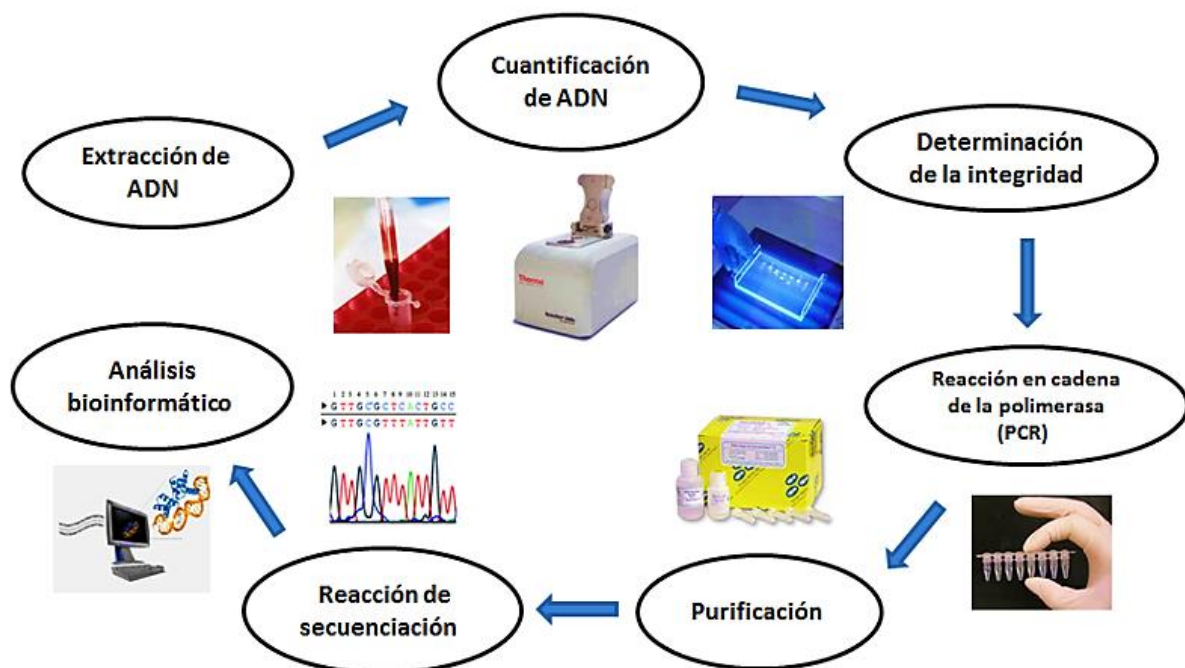


Figura 20. Diagrama general del proceso de las muestras que inicia desde la extracción de ADN hasta su secuenciación y análisis bioinformático.

7.1 Población de estudio

Pacientes.

Se analizaron un total de 82 muestras, de las cuales 41 pertenecían al grupo de pacientes con probable EA (24 mujeres y 17 hombres) con una edad promedio de inicio de 65.6 años (rango de 46 a 74 años) y 41 casos de pacientes con probable DFT (22 mujeres y 19 hombres) con una edad promedio de 65.6 años (rango de 51 a 75 años) bajo las siguientes características:

1. Criterios de inclusión

Individuos diagnosticados como casos probables de EA y casos de DFT que cumplieron con los criterios clínicos establecidos en el DSM-IV y que fueron evaluados por neurólogos y psiquiatras especializados.

2. Criterios de exclusión

Individuos que no cumplieron los criterios clínicos de cada una de las enfermedades antes mencionadas y que no aceptaron participar.

Grupo control.

Se emplearon 25 controles mayores de 50 años (14 mujeres y 11 hombres, con un rango de edad de 56 a 74 años y edad promedio de 63 años bajo los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión

Individuos sin antecedentes familiares de enfermedades neurológicas.

Individuos con padres y abuelos mexicanos o con al menos un abuelo español.

2. Criterios de exclusión

Individuos con antecedentes familiares de enfermedades neurológicas.

Individuos con padres y/o abuelos extranjeros no españoles.

Para el análisis, se incluyeron muestras del banco de ADN de pacientes con EA y DFT, así como las muestras que fueron captadas durante la realización del proyecto a las cuales se les extrajo el ADN. A todos los pacientes se les tomó una muestra de sangre periférica previo consentimiento informado y de acuerdo al diagrama de la Figura 20 se inició el proceso de:

7.2 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica. Para la extracción de ADN de las muestras se utilizó el método modificado de Miller (técnica de precipitación por sales, técnica modificada por el laboratorio; Miller, Dykes & Polesky, 1988).

1. Se colocaron 3 mL de sangre periférica en tubos Falcon de 15 mL y se adicionaron 3 volúmenes de la Solución de Lisis de Glóbulos Rojos (SLGR) lisando así los glóbulos rojos presentes, la SLGR contiene los siguientes reactivos en un volumen final de 2L y un pH de 7.4 en las concentraciones indicadas: EDTA 0.5mM, KHCO_3 10mM y NH_4Cl 0.15M.
2. Las muestras se homogeneizaron por inversión y se centrifugaron a 3000 rpm durante 6 minutos.
3. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1mL de SLGR para resuspender el botón obtenido y tras pasarlo a un microtubo de 1.5 mL, nuevamente se agregó 1mL de SLGR, se homogeneizó el botón obtenido y se centrifugó a 3000rpm durante 2 minutos, dicho procedimiento se repitió 3 veces hasta observar que las muestras estuvieran libres de glóbulos rojos.
4. El siguiente paso consistió en la lisis los glóbulos blancos: a cada microtubo de 1.5mL se agregó un volumen de 540 μL de una solución de NaCl 0.5 mM, 40 μL de SDS al 10% (para degradar la membrana celular) y finalmente la precipitación de las proteínas utilizando 200 μL de una solución saturada de NaCl, en cada paso se homogeneizó la mezcla contenida en los microtubos y finalmente se centrifugaron a 11,500 rpm durante 20 minutos y una temperatura de 4°C.
5. El sobrenadante obtenido se decantó en un nuevo microtubo de 1.5 mL y se adicionaron 700 μL de una mezcla 49:1 de cloroformo y alcohol isoamílico lo cual permitió separar el ADN de otros compuestos

remanentes como lípidos de membrana; la mezcla obtenida se homogeneizó y se centrifugaron los tubos a 14000rpm durante 20 minutos a 4°C obteniendo dos fases: una orgánica y una acuosa.

6. Se separó la fase acuosa con ayuda de una micropipeta y se traspasó a un microtubo 1.5 mL, a continuación se precipitó el ADN agregando 700 μ L de etanol absoluto, se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y posteriormente el ADN se sometió a un lavado con 700 μ L de etanol al 70% centrifugando nuevamente a 14000rpm durante 15 minutos a 4°C.
7. Se decantó el sobrenadante y el botón de ADN fue secado en un concentrador de vacío (*Eppendorf Concentrator 5301*) durante 45 minutos, una vez seca la muestra se agregó un volumen de 250 μ L de agua estéril para resuspender el ADN obtenido, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

7.3 Cuantificación del ADN. Se determinó la concentración de cada muestra utilizando un espectrómetro de UV-visible (equipo *NanoDrop 2000 Spectrophotometer*) a las longitudes de onda de 280nm y 260nm para la cuantificación de proteínas y ADN respectivamente; se colocaron 2 μ L de la muestra en el paso óptico del equipo para obtener la concentración expresada en las unidades de *ng/ μ L* y el cociente de las longitudes mencionadas (A_{260}/A_{280}) el cual fue indicativo de la pureza del ADN obtenido.

El ADN de las muestras analizadas mostró en promedio una concentración de 585.3 *ng/ μ L* con un rango de pureza de 1.80 a 1.95 de acuerdo a la relación A_{260}/A_{280} .

Una vez realizado este análisis se prepararon diluciones de las muestras de ADN a una concentración final de 100 *ng/ μ L*, concentración necesaria para llevar a

cabo la técnica de PCR, las diluciones también fueron almacenadas a 4°C para su posterior uso.

7.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se estandarizó la técnica de PCR mediante gradientes de temperatura y concentración de oligonucleótidos, permitiendo así la amplificación de los exones 1, 2, 3, 8 y 10 del gen *MAPT*, en la Tabla 8 se muestran las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos empleados:

Tabla 8. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los exones de interés, se muestra la temperatura de alineamiento específica para cada exón.

Exón	Oligonucleótido sentido (5' - 3')	Oligonucleótido antisentido (5' - 3')	Tm (°C)
1	1F	1R	68.5
2	2F	2R	60.5
3	3F	3R	61.4
8	8F	8R	61.0
10*	10F	10R	68.4

*Para la amplificación del exón 10 se requirió utilizar la técnica de *PCR TouchDown* partiendo de la temperatura establecida en la Tabla 8.

En la Figura 21 se muestra la ubicación aproximada de los oligonucleótidos empleados:

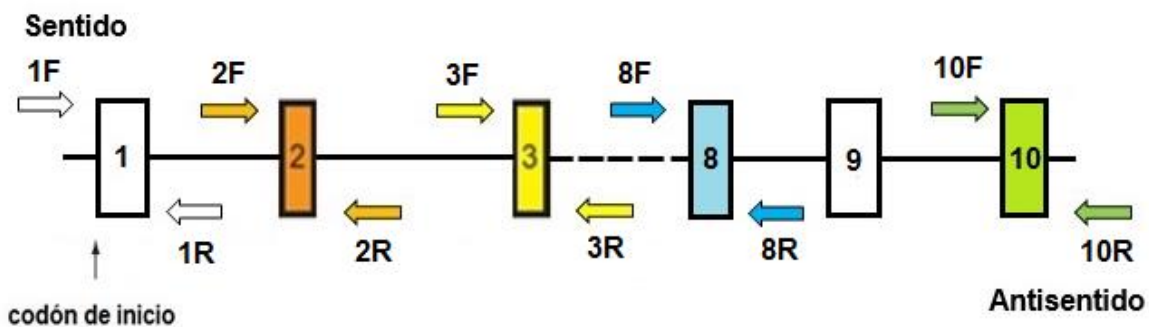


Figura 21. Cada par de oligonucleótidos se diseñó flanqueando los exones 1, 2, 3, 8 y 10 de *MAPT* con el fin de asegurar la amplificación de los mismos.

Para efectuar la técnica de PCR se utilizó la mezcla *KAPA2G Robust HotStart* PCR Kit que contenía los siguientes elementos:

- La enzima ADN polimerasa ***KAPA2G Robust HotStart (5 U/μL)***.
- Desoxirribonucleótidos Trifosfatados (dNTPs) con una concentración de 10mM para cada dNTP.
- Amortiguador para PCR ***KAPA2G Robust HotStart***.
- MgCl₂, 1X, en una concentración final de 1.5 mM.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación mediante gradientes de temperatura y concentración de oligonucleótidos se preparó la mezcla final de reacción que contenía los componentes descritos en la Tabla 9:

Tabla 9. Reactivos empleados para la amplificación de los exones de interés.

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)
Mezcla <i>KAPA2G Robust HotStart</i>	-	12.5
ADN genómico	100 ng/μL	2.0
Oligonucleótido sentido	10 μM	1.0
Oligonucleótido antisentido	10 μM	1.0
H ₂ O c.b.p 25 μL	-	8.5

Posteriormente, se procedió a colocar las reacciones en el termociclador GeneAmp System PCR 9700 de Applied Biosystems para realizar el proceso de amplificación utilizando el programa descrito en la Figura 22, este también se estandarizó y estableció previamente:

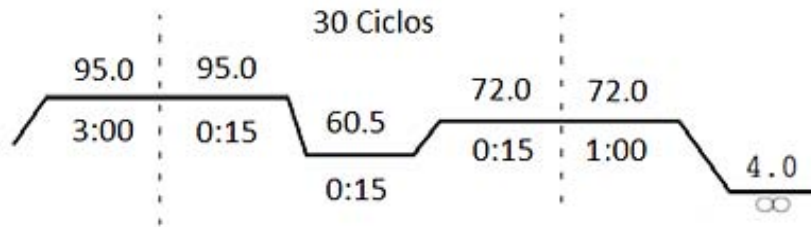


Figura 22. Programa utilizado para llevar a cabo la amplificación de los exones 1, 2, 3 y 8 del gen MAPT mediante la técnica de PCR. Se inicia con una desnaturalización de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de tres temperaturas: una segunda desnaturalización a 95°C, la etapa de alineamiento (T_m °C) de los oligonucleótidos y la etapa de elongación del templado a 72°C (las tres etapas se efectúan durante 15s), finalizando con una elongación de 1 minuto a 72°C y almacenamiento a 4.0°C.

Como se mencionó anteriormente, la amplificación del exón 10 requirió el uso de la técnica de *PCR Touchdown*. Esta técnica consistió en establecer una T_m (*melting temperature*) 10°C por encima de la T_m comúnmente utilizada y un descenso gradual de la temperatura durante cada ciclo, el programa que se estableció se muestra en la Figura 23:

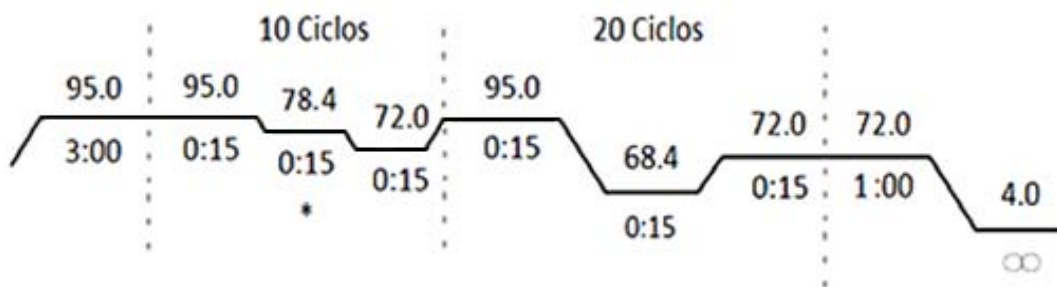


Figura 23. Programa utilizado para llevar a cabo la amplificación del exón 10 del gen MAPT mediante la técnica de PCR Touchdown. Se utilizaron dos etapas para efectuar la amplificación, se comienza con una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, seguido de 10 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, una temperatura de alineamiento comenzando desde 78.4°C y disminuyendo 1°C (hasta llegar a 68.4°C) por ciclo durante 15 segundos y una temperatura de elongación a 72°C por 15 segundos, la segunda etapa consistió en un bloque de 20 ciclos con las temperaturas de desnaturalización, alineamiento y elongación antes descritas (con una temperatura constante de alineamiento de 68.4°C) y finalizando con una elongación de 1 minuto a 72°C.

7.5 Resolución de los productos de PCR. Los productos de la PCR se analizaron mediante el corrimiento electroforético en geles de agarosa al 2%, los geles se prepararon pesando 2 gramos de agarosa grado biología molecular por cada 100 mL de amortiguador de Sodio-Borato (SB) al 1%, al preparar el gel se adicionó 1µL de bromuro de etidio (10mg/mL) por cada 100 mL de gel.

Electroforesis:

1. Se realizó la electroforesis de los productos previamente obtenidos mezclando 2 µL del producto amplificado con 2 µL de colorante de carga 1X preparado a partir del stock al 6X, el cual contenía los siguientes reactivos: Tris 10Mm, azul de bromofenol al 0.03%, xilencianol al 0.03%, glicerol al 60% y EDTA 60Mm con un pH de 7.6.
2. Se utilizó 1µL del marcador de peso molecular O´Generuler™ 100bp DNA ladder (Thermo Scientific) con un rango de 100 a 1000 pb para determinar el tamaño relativo de los productos obtenidos.
3. El corrimiento electroforético se realizó a 100V durante 30 minutos, posteriormente, el gel se colocó sobre un transiluminador de luz ultravioleta para visualizar las bandas del producto de PCR, finalmente se obtuvo una imagen del gel empleando el fotodocumentador Gel Doc™ XR+ (BioRad).

7.6 Purificación de los productos de PCR. La purificación de las muestras se realizó empleando el estuche comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, purificación de ADN por columnas de la marca Promega* para remover posibles nucleótidos y oligonucleótidos no incorporados.

Se realizó el siguiente procedimiento de acuerdo a lo recomendado por el proveedor:

1. **Unión del ADN.** Al volumen del producto amplificado se adicionó un volumen equivalente de la “solución de unión a membrana” (relación v/v), se homogeneizó la mezcla y se traspasó a una columna de purificación colocada previamente sobre un tubo colector y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente.

Se centrifugó a 16000 rcf durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante del tubo colector.

2. **Lavado.** El siguiente paso consistió en agregar 700 μL de la “solución de lavado de membrana” a la columna y se centrifugó a 16000 rcf durante 1 minuto, nuevamente se descartó el líquido remanente del tubo colector.

Se repitió el paso anterior, pero esta vez agregando 500 μL de la “solución de lavado de membrana”, se centrifugó a 16000 rcf durante 5 minutos, se descartó el líquido remanente y nuevamente se centrifugó la columna para eliminar el exceso de etanol.

3. **Elución.** Finalmente, se colocó la columna de purificación en un microtubo de 1.5 mL, se agregó un volumen de 20 μL de agua libre de nucleasas, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 rcf por 1 minuto.

Los productos purificados de PCR nuevamente se visualizaron en geles de agarosa preparados al 2% con el fin de corroborar que no se perdieron durante el proceso de purificación.

7.7 Reacción de secuenciación. Está basada en la técnica modificada de Sanger, para llevar a cabo este procedimiento se utilizó el estuche comercial de secuenciación *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing*, los reactivos empleados se describen en la Tabla 10:

Tabla 10. Reactivos empleados para llevar a cabo la reacción de secuenciación de los exones de interés.

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)
<i>BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing</i>	-	1.0
Amortiguador	5.0 X	4.0
Purificado de PCR	-	2.0
Oligonucleótido*	10µM	1.0
H ₂ O cpb 20 µL	-	12.0

*Se realizó la secuenciación de una cadena empleado el oligonucleótido sentido o antisentido; al encontrar alguna variación en las muestras analizadas estas se volvieron a secuenciar utilizando el oligonucleótido complementario para así confirmar el resultado obtenido.

La reacción de secuenciación se realizó en el termociclador *GeneAmp System PCR 9700* de Applied Biosystems utilizando el programa de la Figura 24:

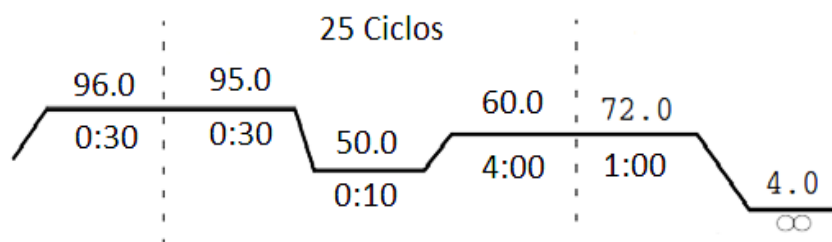


Figura 24. Programa utilizado para llevar a cabo la reacción de secuenciación de los exones 1, 2, 3, 8 y 10 del gen *MAPT*. El programa mostrado es similar a los utilizados anteriormente para la técnica de PCR, sin embargo en este caso tan solo se emplean 25 ciclos.

7.8 Purificación de los productos de secuenciación. Los productos obtenidos se purificaron utilizando columnas Centri-Sep (*Princeton Separations*), las columnas se prepararon previamente adicionando 800 μ L de agua estéril y se dejaron hidratar durante 30 minutos almacenadas a 4°C.

El procedimiento de purificación consistió en lo siguiente:

1. Se colocó una columna hidratada sobre un tubo colector y se centrifugó a 3000 rpm durante 90 segundos para la remoción del agua, el sobrenadante se descartó y la columna se colocó en un microtubo de 1.5 mL.
2. El producto obtenido de la reacción de secuencia se transfirió a la columna y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos.
3. La muestra se colocó en el concentrador de vacío (Eppendorf Concentrator 5301) hasta que estuviera totalmente seca.

7.9 Secuenciación automatizada. El producto seco se resuspendió con 14 μ L de formamida ultra pura y se colocó en una placa de 96 pozos, las muestras se desnaturalizaron a 94°C durante 5 minutos y finalmente fueron analizadas en el secuenciador automatizado ABI PRISM 3130.

7.10 Análisis de las secuencias. Se utilizó el programa Sequencher™ 5.1 Gene Codes Corporation para analizar los electroferogramas obtenidos, se consultaron las bases de datos de *NCBI*, *Ensemble* y el programa bioinformático *Human Splicing Finder* (HSF).

8. RESULTADOS.

Los objetivos de este trabajo consistieron en el análisis de los exones 2, 3 y 10 del gen *MAPT*, sin embargo, la nomenclatura del gen anteriormente incluía al exón 1, debido a que dicho exón no es traducible actualmente se nombra exón -1 (como se muestra en la Figura 8), este cambio tiene como consecuencia un corrimiento en el número de los exones con la finalidad de incluir solamente los exones codificantes. De acuerdo a esta observación, en un inicio realmente se analizaron los exones 1, 2 y 8 y con el fin de cumplir con los objetivos establecidos se corrigió el análisis incluyendo los exones 3 y 10.

8.1 Análisis de los productos de PCR.

En la Figura 25 se muestra el corrimiento electroforético de los productos esperados para los exones 1, 2, 3, 8 y 10 del gen *MAPT* amplificados por la técnica de PCR:

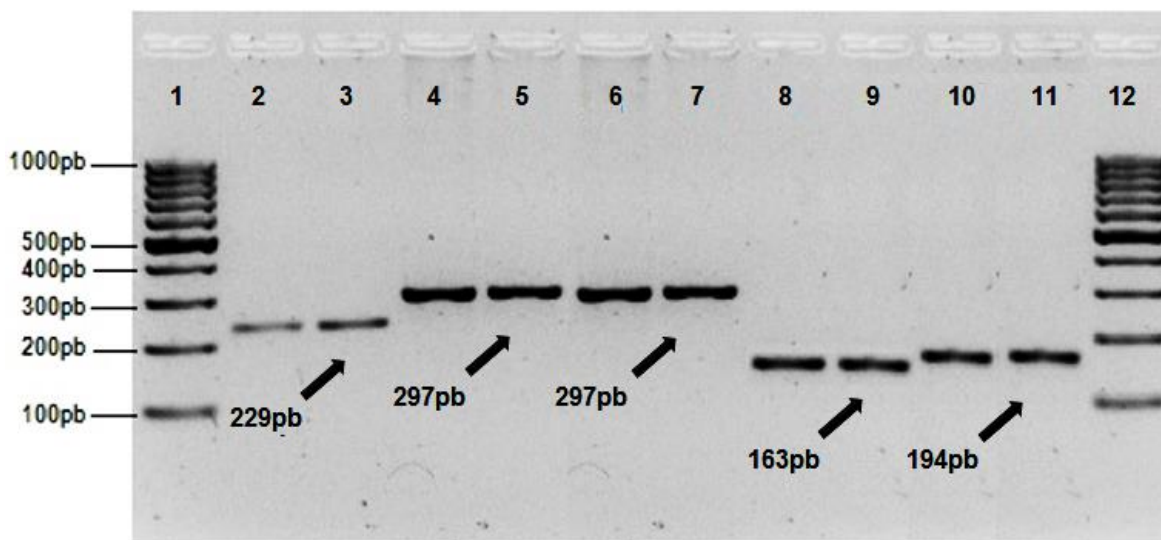


Figura 25. Resolución de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (10mg/mL). Se emplea el marcador de peso molecular Generuler™ 100bp DNA ladder (con un rango de 100 a 1000 pb) en los carriles 1 y 12, los carriles 2 y 3 corresponden al exón 1 (229 pb), los carriles 4 y 5 al exón 2 (297 pb), el exón 3 en los carriles 6 y 7 (297 pb), los carriles 8 y 9 corresponden al exón 8 (163pb) y los productos amplificados del exón 10 se muestran en los carriles 10 y 11 (194pb).

8.2 Variaciones encontradas.

En la muestra estudiada no se encontraron mutaciones en los exones analizados, sin embargo, se detectaron 4 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): uno en la región 5'-UTR (13 pb río arriba del exón 1), dos en la regiones intrónicas de los exones 2 y 3 (18 pb río abajo del exón 2 y 9 pb río abajo del exón 3) y una mutación sinónima en la parte codificante del exón 8, los electroferogramas parciales de cada una de las variaciones descritas se muestran en las Figuras 26, 27, 28 y 29:

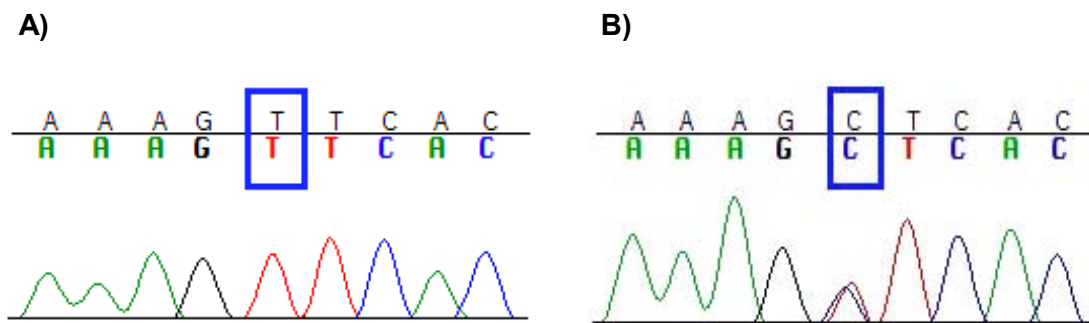


Figura 26. Electroferogramas parciales de la región 5'UTR. A) Secuencia antisentido de referencia (alelo silvestre T) y B) Secuencia parcial antisentido, cambio de T → C, (el cambio en la cadena sentido es A → G).

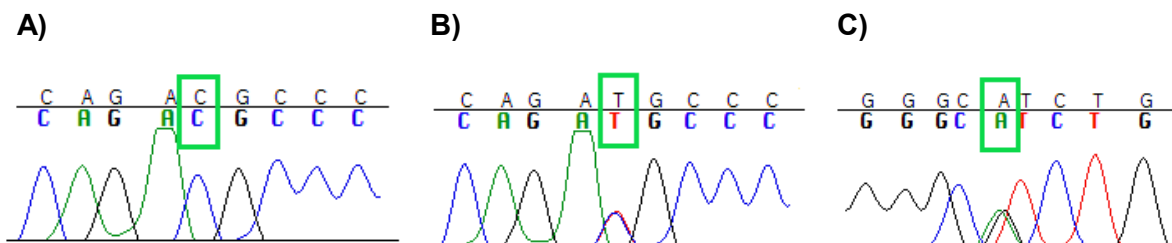


Figura 27. Electroferogramas parciales del intrón 2-3. A) Secuencia parcial de referencia (alelo silvestre C), B) Secuencia parcial sentido (cambio de C → T) y C) Secuencia parcial antisentido con la cual se confirma el cambio encontrado (cambio de G → A).

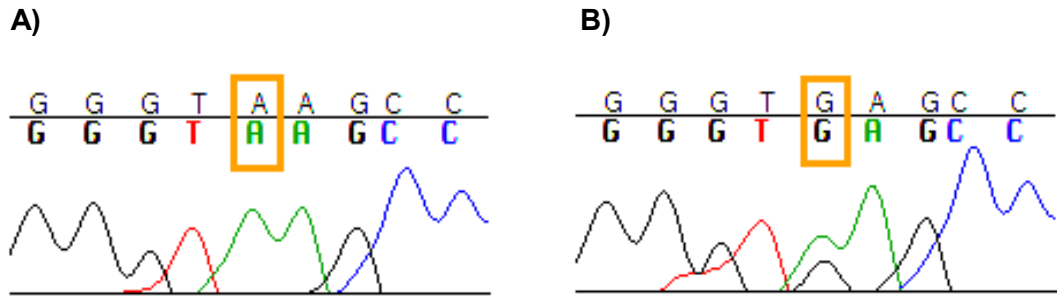


Figura 28. Electroferogramas parciales del intrón 3-4. A) Secuencia parcial de referencia (alelo silvestre A), B) Secuencia parcial sentido (cambio de A → G), (el cambio en la cadena antisentido es T → C).

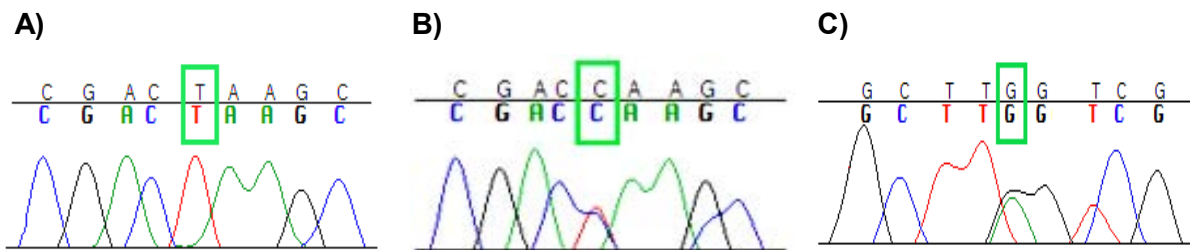


Figura 29. Electroferogramas parciales del exón 8. A) Secuencia parcial de referencia (alelo silvestre T), B) Secuencia parcial sentido (cambio de T → C) y C) Secuencia parcial antisentido con la cual se confirma el cambio encontrado (cambio de A → G).

Los SNP identificados ya han sido reportados en la base de datos de los 1000 Genomas y *HapMap* en diferentes poblaciones incluyendo la México-Americana, no obstante, estos cambios también se buscaron en un grupo control de 25 individuos sanos con edades por encima de 50 años (C). La Tabla 11 muestra el número de pacientes y controles en los que se detectó cada uno de los cambios antes descritos:

Tabla 11. Cambios encontrados en pacientes con EA, DFT y el grupo C.

Localización	SNP	Sustitución	EA n=41	DFT n=41	C n=25
5'UTR	rs17650901	A → G	10	10	6
Intrón 2 - 3	rs75242405	C → T	10	10	6
Intrón 3 - 4	rs1800547	A → G	10	8	6
Exón 8	rs62063845	ACT- ACC	10	9	6

En las Tablas 12, 13, 14 y 15 se presentan las frecuencias genotípicas de los SNPs en la muestra analizada:

Tabla 12. Frecuencias genotípicas del SNP rs17650901 (A → G)

Genotipo	EA (%)	DFT (%)	C (%)
A/A	75.60	75.60	76.0
A/G	24.40	24.40	24.0
G/G	0	0	0

Tabla 13. Frecuencias genotípicas del SNP rs75242405 (C → T)

Genotipo	EA (%)	DFT (%)	CTAs (%)
C/C	75.60	75.60	76.0
C/T	24.40	22.0	24.0
T/T	0	2.40	0

Tabla 14. Frecuencias genotípicas del SNP rs1800547 (A → G)

Genotipo	EA (%)	DFT (%)	CTAs (%)
A/A	75.60	80.0	76.0
A/G	24.40	17.50	24.0
G/G	0	2.50	0

Tabla 15. Frecuencias genotípicas del SNP rs62063845 (T → C)

Genotipo	EA (%)	DFT (%)	CTAs (%)
T/T	75.60	78.0	76.0
T/C	24.40	19.50	24.0
C/C	0	2.50	0

Los SNPs identificados también se encuentran reportados en las bases de datos de *Ensembl Genome Browser* y NCBI (dbSNP, *Short Genetic Variations*), sin embargo, no hay información relacionada que indique si estos cambios tengan relación con la EA o la DFT.

Para comprobar si existían diferencias significativas entre los grupos, se empleó el programa *GraphPad Prism 5* aplicando la prueba chi cuadrada (χ^2), en cada caso se compararon los genotipos de cada grupo de pacientes, comparando con el grupo control y entre grupos (EA vs. DFT) como se muestra en la Tabla 16:

Tabla 16. Valores obtenidos de acuerdo al análisis estadístico ($p < 0.05$).

SNP	Cambio	EA vs C	DFT vs C	EA vs DFT
rs17650901	A → G	1.0000	1.0000	1.0000
rs75242405	C → T	1.0000	0.7266	0.5908
rs1800547	A → G	1.0000	0.6933	0.5687
rs62063845	T → C	1.0000	0.6819	0.5385

Se sabe que la mayoría de las mutaciones descritas en *MAPT* tienen como consecuencia alteraciones en el proceso de *splicing* alternativo (SA), por lo que se evaluó la participación de los SNPs rs17650901, rs75242405, rs1800547 (ubicados en regiones no traducibles) y el SNP rs62063845 en los mecanismos implicados en el *splicing* de los exones 1, 2, 3 y 8 respectivamente.

Existen diversas herramientas bioinformáticas que pueden servir para evaluar alteraciones en el SA, en este caso se inició utilizando la herramienta bioinformática *Splice view for splicing signals prediction* con el fin de localizar las secuencias consenso de *splicing* aledañas a dichos exones. *Splice view* está basado en el hecho de que la alta frecuencia de nucleótidos en posiciones definidas dentro de una región refleja una importancia funcional para preservar dichos nucleótidos en esas posiciones; *Splice View* reconoce secuencias de 9pb para predecir los posibles sitios donadores (con una precisión del 95%) y de 20pb para los sitios aceptores (con una precisión del 93%).

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos, donde se resaltan en negritas las secuencias consenso (**AG**, **GT**) de los sitios aceptores y donadores así como las regiones exónicas e intrónicas que flanquean dichos sitios:

Figura 30. Sitios consenso detectados mediante el programa *Splice View*.

Exón	Posición	Aceptor	Posición	Donador
1	Intrón - Exón	TTTCCCCAG - GTGA	Exón - Intrón	AAG - GTTAGT
2	Intrón - Exón	GTGTTCCAG - AATC	Exón - Intrón	AAG - GTGGGC
3	Intrón - Exón	GGTTTCTAG - ATGT	Exón - Intrón	CAG - GTGAGG
8	Intrón - Exón	CTCTTTAAG - CGAC	Exón - Intrón	GAG - GTAAGT

Asimismo, se muestra la localización de estas secuencias en cada exón, en color azul marino se marca la base en la que se encontró cada SNP:

Sitios consenso detectados para el exón 1.

5'- CCTCTCCTCTTC**TTTCCCCAG****GTGA**ACTTGAAACCAGGATGGCTGAGCCCGCCA
GGAGTTCGAAGTGATACACGGACGCTGGCCTGA**AAG****GT****TAAGT**GGACAGCCATGCAC
AGCAGGC - 3'

Sitios consenso detectados para el exón 2.

5'- TCACTGTAT**GTGTTCCAG****AATC**TCCCCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGA
GGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCAACAGCGGA**AAG****GT****GGGC**
CCCCCTTCAGAC**C**GCCCC - 3'

Sitios consenso detectados para el exón 3.

5'- CTCGGT**GGTTTCTAG****ATGT**GACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGGC
AAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCCACACGGAGATCCCAGAAGGAACCA**CAG****GT****GAGG**
GT**A**AGCCCCAGAGACC - 3'

Sitios consenso detectados para el exón 8.

5' - AGGCTTTCGTGGATTTTT**CTCTTTAAG****CGACT**AAGCAAGTCCAGAGAAGACCACC
CCCTGCAGGGCCCAGATCTGAGA**GAG****GT****ACTC**GGGAGCCTACTTCGCTGGG - 3'

El análisis prosiguió con la búsqueda de alteraciones en los elementos *cis* que estuvieran ya sea cerca o dentro de los exones analizados y si los SNPs encontrados tenían un papel importante en el SA de la proteína tau. Se empleó el programa *Human Splicing Finder* (HSF) que es una herramienta bioinformática creada con la finalidad de identificar las secuencias consenso de los sitios aceptores y donadores, otros motivos de *splicing* (relacionados con las señales reguladoras) en cualquier secuencia humana y para predecir los efectos de una mutación dentro de estos motivos.

Los algoritmos de predicción de HSF se basan en la evaluación de cambios en la secuencia de ADN debidos a mutaciones exónicas e intrónicas previamente reportadas o que se sabe afectan el proceso de *splicing* en determinadas enfermedades humanas, además, HSF se encuentra vinculado a la base de datos de transcritos de ENSEMBL.

La matriz HSF (que es la representación gráfica del algoritmo de predicción HSF) tiene un rango de 0 a 100, donde los sitios candidatos que son considerados con “mayor fuerza” a ser sitios de *splicing* están localizados en un área de color de amarillo (sitios con valores por encima de 80), por otro lado, los sitios de *splicing* encontrados en el área de color verde claro (sitios entre los valores de 70 y 80) se consideran como sitios potenciales o probables de *splicing*, pero no son tan “fuertes” como los localizados en la zona de amarillo.

Asimismo, en la matriz HSF se tienen las siguientes representaciones: cuadrados azul claro que indican los sitios aceptores, círculos morados que indican los sitios donadores y los sitios de *splicing* silvestres se encuentran marcados en color blanco.

En la Figura 31 se muestra el análisis efectuado con el programa HSF, donde se marca en color azul la región que abarca el exón 1, se muestran los sitios aceptores y donadores de *splicing* (tanto los silvestres como otros sitios posibles) y en azul claro se denota la localización del SNP rs17650901 (cambio a→g), el cambio se encuentra dentro de la secuencia de un sitio potencial aceptor de *splicing*.

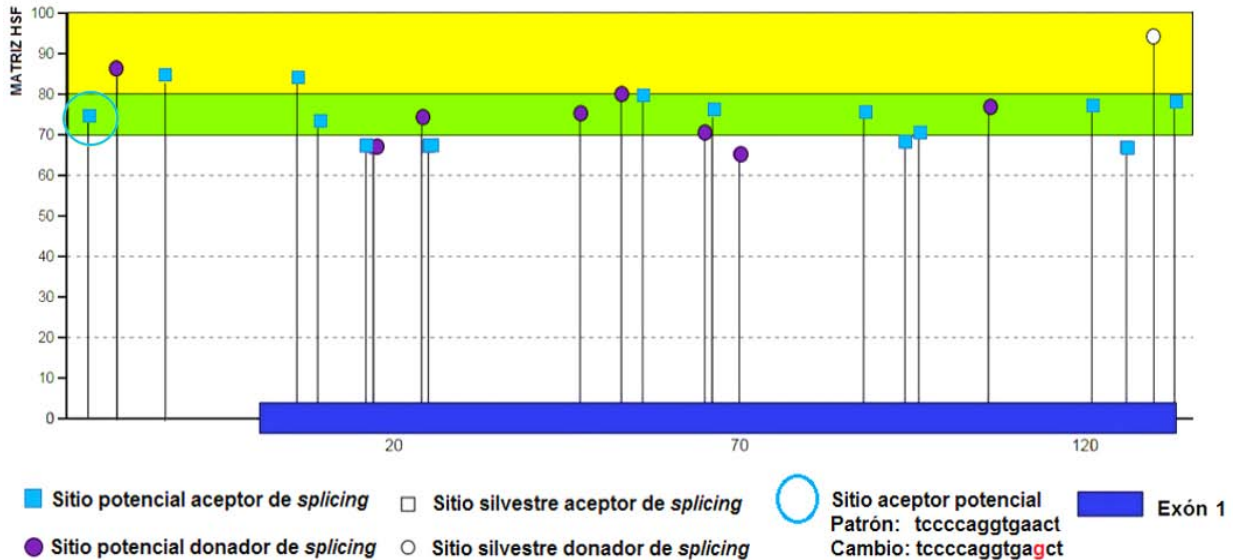


Figura 31. Ubicación de los sitios de *splicing* de la región 5'UTR.

Posteriormente se efectuó el análisis “mutación” con el programa HSF, a continuación se muestran las secuencias analizadas, donde se marca en letras mayúsculas la región codificante del exón 1, en minúsculas las regiones intrónicas, en color verde se marca el alelo silvestre (a) y en rojo el alelo mutado (g), este cambio recae en la región 5'UTR, como se muestra a continuación:

Secuencia de referencia

5' caactctct	cagaacttat	cctctcctct	tctttcccca	ggtga a cttt	gaaccaggAT
GGCTGAGCC	CGCCAGGAGT	TCGAAGTGAT	GGAAGATCAC	GCTGGGACGT	ACGGGTTGGG
GGACAGGAAA	GATCAGGGGG	GCTACACCAT	GCACCAAGAC	CAAGAGGGTG	ACACGGACGC
TGCCTGAAA	Ggtagtgga	cagccatgca	cagcaggccc	agatcactg	3'

Secuencia mutada

5' caacactcct cagaacttat cctctcctct tctttcccca ggtga^gcttt gaaccaggAT
 GGCTGAGCC CGCCAGGAGT TCGAAGTGAT GGAAGATCAC GCTGGGACGT ACGGGTTGGG
 GGACAGGAAA GATCAGGGGG GCTACACCAT GCACCAAGAC CAAGAGGGTG ACACGGACGC
 TGGCCTGAAA Ggtagtgga cagccatgca cagcaggccc agatcactg 3'

En la Tabla 17 se presenta el efecto predicho de este cambio de acuerdo al programa HSF, mientras que en la Tabla 18 se muestran los parámetros obtenidos de acuerdo a este análisis:

Tabla 17. Posible efecto del SNP rs17650901 sobre el *splicing* constitutivo del exón 1 de *MAPT*.

Señal predicha	Algoritmo de predicción	Interpretación
Nuevo sitio aceptor	Matriz HSF	Activación de un sitio aceptor crítico intrónico, alteración potencial del <i>splicing</i>

Tabla 18. Resultados obtenidos de la predicción de acuerdo al programa HSF.

Sitio de <i>splicing</i>	Motivo	Nuevo sitio	WT	Mutante	%Variación	Variación en la longitud del exón
Aceptor	tcccaggtga ^a ct	tcccaggtga ^g ct	42.51	71.46	Nuevo sitio +68.1	+12

El mismo análisis se realizó para el SNP rs75242405 (cambio c → t), en la Figura 32 se muestran los sitios de *splicing* aledaños al exón 2, en este caso el cambio también se ubica dentro de un sitio potencial aceptor de *splicing*:

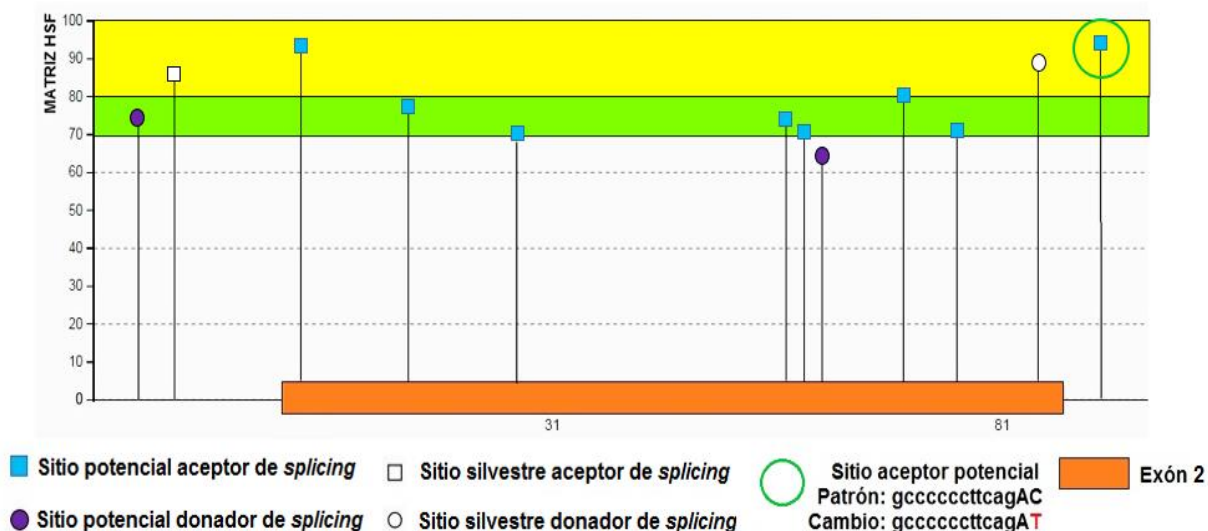


Figura 32. Ubicación de los sitios de *splicing* del intrón 2-3.

A continuación se presentan las secuencias analizadas, se marca en letras mayúsculas la región codificante del exón 2, en minúsculas las regiones intrónicas, en color verde el nucleótido en el que se encontró el cambio (c como alelo silvestre) y en color rojo el cambio encontrado (t como alelo mutado):

Secuencia de referencia

5' cagctccaca	ggacactgct	ccccagttcc	tcctgagaac	aaaagggggc	gctggggaga
ggccaccgtt	ctgagggctc	actgtatgtg	ttccagAATC	TCCCCTGCAG	ACCCCACTG
AGGACGGATC	TGAGGAACCG	GGCTCTGAAA	CCTCTGATGC	TAAGAGCACT	CCAACAGCGG
AAGgtgggcc	cccttcaga	c gccccctcc	atgcctccag	cctgtgctta	gccgtgcttt
gagcctcct	cctggctgca	tctgctgctc	ccctggctg	agagatgtgc	tcactcc 3'

Secuencia mutada

5' cagctccaca	ggacactgct	ccccagttcc	tcctgagaac	aaaagggggc	gctggggaga
ggccaccgtt	ctgagggctc	actgtatgtg	ttccagAATC	TCCCCTGCAG	ACCCCACTG
AGGACGGATC	TGAGGAACCG	GGCTCTGAAA	CCTCTGATGC	TAAGAGCACT	CCAACAGCGG
AAGgtgggcc	cccttcaga	t gccccctcc	atgcctccag	cctgtgctta	gccgtgcttt
gagcctcct	cctggctgca	tctgctgctc	ccctggctg	agagatgtgc	tcactcc 3'

En la Tabla 19 se presenta el posible efecto de este cambio de acuerdo al programa HSF:

Tabla 19. Posible efecto del SNP rs75242405 sobre el *splicing alternativo* del exón 2 de *MAPT*.

Señal predicha	Algoritmos de predicción	Interpretación
Nuevo sitio ESE	1- Secuencias ESR de Goren y cols. 2- Hexámeros RESCUE ESE 3- EIEs de Zhang y cols.	Creación de un sitio ESE intrónico, alteración potencial del <i>splicing</i> .

La Figura 33 muestra la ubicación del SNP rs1800547 (cambio a → g), dicho cambio se ubica cerca del exón 3 que se marca en amarillo, el cambio recae sobre la secuencia de un sitio potencial donador de *splicing*:

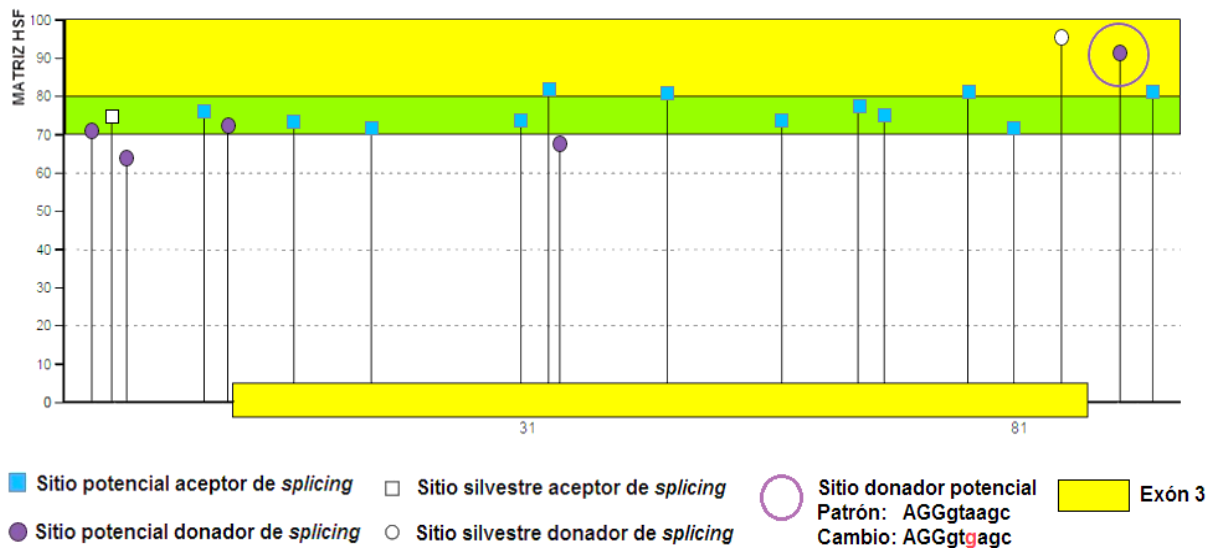


Figura 33. Ubicación de los sitios de *splicing* del intrón 2-3.

Nuevamente se muestran las secuencias analizadas, se marca en letras mayúsculas la región codificante del exón 3, en minúsculas las regiones intrónicas, en color verde el nucleótido en el que se encontró el cambio (a como alelo silvestre) y en color rojo el cambio encontrado (g como alelo mutado):

Secuencia de referencia

5' gggctgcttt	ctggcatatg	gctgatcccc	tcctcactcc	tcctccctgc	attgctcctg
cgcaagaagc	aaaggtgagg	ggctgggtat	ggctcgtcct	ggccccctcta	aggtggatct
cggtggtttc	tagATGTGAC	AGCACCTTA	GTGGATGAGG	GAGCTCCCCG	CAAGCAGGCT
GCCGCGCAGC	CCCACACGGA	GATCCCAGAA	GGAACCACAG	gtgagggtaa	gccccagaga
ccccaggca	gtcaaggccc	tgctgggtgc	cccagctgac	ctgtgacaga	agtgagg 3'

Secuencia mutada

5' gggctgcttt	ctggcatatg	gctgatcccc	tcctcactcc	tcctccctgc	attgctcctg
cgcaagaagc	aaaggtgagg	ggctgggtat	ggctcgtcct	ggccccctcta	aggtggatct
cggtggtttc	tagATGTGAC	AGCACCTTA	GTGGATGAGG	GAGCTCCCCG	CAAGCAGGCT
GCCGCGCAGC	CCCACACGGA	GATCCCAGAA	GGAACCACAG	gtgagggtga	gccccagaga
ccccaggca	gtcaaggccc	tgctgggtgc	cccagctgac	ctgtgacaga	agtgagg 3'

El programa HSF no predice alteración sobre los sitios de *splicing* cercanos al exón 3 de *MAPT*.

Finalmente, se analizó el cambio sinónimo para treonina (ACT/ACC) ubicado en el exón 8, en la Figura 34 se muestran los sitios de *splicing* de dicho exón:

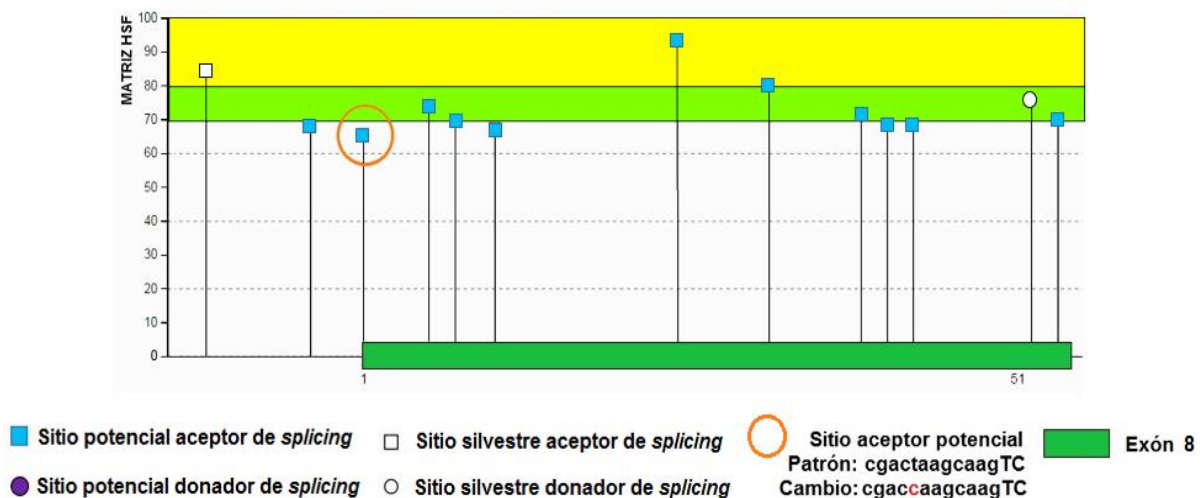


Figura 34. Ubicación de los sitios de *splicing* del exón 8.

Secuencia de referencia

5' ggtgcctgcc acgtgaagga ctcattaagg ccctgtttaa gcctgatgat aataaggctt
tcgtggattt ttctctttaa gCGACTAAGC AAGTCCAGAG AAGACCACCC CCTGCAGGGC
CCAGATCTGA GAGAGgtact cgggagccta cttcgctggg 3'

Secuencia mutada

5' ggtgcctgcc acgtgaagga ctcattaagg ccctgtttaa gcctgatgat aataaggctt
tcgtggattt ttctctttaa gCGACC AAGC AAGTCCAGAG AAGACCACCC CCTGCAGGGC
CCAGATCTGA GAGAGgtact cgggagccta cttcgctggg 3'

Para este cambio, el programa HSF tampoco predice alguna alteración sobre los sitios de *splicing* del exón 8 de *MAPT*.

Cabe mencionar que no se encontraron polimorfismos o mutaciones en el exón 10 que es considerado el exón en el cual se han reportado el mayor número de mutaciones patogénicas.

En la Tabla 20 se resume la información obtenida de acuerdo al programa HSF:

Tabla 20. Características de las variaciones encontradas.

SNP	Ubicación	Cambio	Consecuencia
rs17650901	5'UTR	A → G	Posible alteración del <i>splicing</i>
rs75242405	Intrón 2-3	C → T	Posible alteración del <i>splicing</i>
rs1800547	Intrón 3-4	A → G	Sin consecuencias
rs62063845	Exón 8	ACT- ACC	Cambio sinónimo

9. DISCUSIÓN.

Una vez amplificadas las regiones de interés por medio de la técnica de PCR (figura 25) se procedió a efectuar la secuenciación de las muestras de pacientes con EA, DFT y el grupo control (C). En las figuras 26, 27, 28 y 29 se presentan los electroferogramas parciales de los exones 1, 2, 3 y 8 respectivamente, cada exón tiene un cambio distinto.

Posteriormente, la Tabla 11 muestra la información global obtenida: la localización de cada cambio en el gen *MAPT* y el número de referencia de cada SNP (estos cambios se consideran SNP debido a que se presentaron en más del 1% de la población de estudio), también se muestra el número de pacientes con EA, DFT y del grupo control con cada SNP -cada SNP se encontró previamente reportado en la base de datos de NCBI / ENSEMBL-.

Por otra parte, en las tablas 12, 13, 14 y 15 se presentan las frecuencias genotípicas de los SNP rs17650901, rs75242405, rs1800547 y rs62063845 para las tres poblaciones de estudio, como se puede observar, las frecuencias del grupo control y del grupo de pacientes son muy similares a excepción de los que siguientes SNP que se encuentran en estado homocigoto en un mismo paciente con DFT: rs75242405 (T/T), rs62063845 (C/C) y el SNP rs1800547 (G/G). La frecuencia observada de cada uno de los 4 SNP es similar a la reportada en los proyectos de los 1000 genomas y HapMap para las poblaciones Americana y Europea.

Se realizó un análisis estadístico para determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos, como se mencionó anteriormente, se empleó el programa *GraphPad Prism 5*, los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Pese a este resultado, se decidió evaluar el posible papel de cada SNP sobre el proceso de *splicing* de *MAPT*.

Para dicha evaluación se utilizó el programa *Splice view*, en la Figura 30 se muestran los sitios consenso que se obtuvieron: las secuencias AG y GT se encuentran marcadas en negritas y con diferentes colores se marcan los exones e intrones que flanquean a estas; para los sitios aceptores se marca en color amarillo la secuencia intrónica y en color morado la exónica, para los sitios donadores se marca en color verde la secuencia exónica y en color azul claro la intrónica, la localización de cada SNP se marca en color azul marino. Los sitios

predichos se encuentran dentro de la región de los productos de PCR amplificadas y concuerdan con lo que se describe en la literatura (revisar Figura 13).

Los resultados desplegados por el programa demuestran que los SNPs encontrados no recaen sobre las secuencias consenso de *splicing* (AG para el sitio aceptor y GT para el sitio donador), no obstante, en la literatura se ha descrito que el análisis de las consecuencias potenciales de una mutación que pueda impactar el proceso de *splicing* debe incluir la posible alteración de otros factores relacionados, entre ellos los factores *cis* antes descritos y no solo evaluar el papel de los sitios donadores y aceptores.

Existen otros factores que también suelen ser evaluados, sin embargo estos son más difíciles de determinar, por ejemplo, factores relacionados con la transcripción del ARN mensajero: estructuras secundarias del ARNm, la ARN polimerasa II, señales extracelulares y el mecanismo de degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (*nonsense-mediated decay* o NMD).

De este modo, se evaluaron los cuatro SNPs utilizando el programa HSF; en la Figura 31 se muestran los sitios aceptores y donadores de *splicing* que flanquean al exón 1, la localización del cambio encontrado se muestra en un círculo azul claro. HSF establece que la secuencia consenso que está incluida en el sitio potencial aceptor de *splicing* es tccccaggtgaact, por lo que la secuencia con el cambio corresponde a la siguiente: tccccaggtgagct (cambio de a → g).

Seguido de la Figura 31 se muestran las secuencias empleadas para determinar el impacto de cada SNP (HSF permite analizar los transcritos de los exones que se encuentran en la base de datos de *ENSEMBL* o analizar secuencias establecidas como fue en este caso).

En la Tabla 17 se presenta el impacto del SNP rs17650901 sobre el *splicing* constitutivo del exón 1 del gen *MAPT*, prediciendo la generación de un nuevo sitio

aceptor de *splicing*, particularmente, la activación de un sitio aceptor críptico intrónico, es decir un sitio aceptor que no se encontraba antes y que puede ser utilizado como tal. El programa HSF incluye algoritmos de predicción para diversos tipos de señales o sitios de *splicing*, entre ellos *HSF* (que fue el utilizado en este caso), *MaxEntScan*, *ESE Finder*, Hexámeros RESCUE ESE, etc.

El algoritmo *HSF* se utiliza para analizar sitios aceptores y donadores de *splicing* y tiene las siguientes consideraciones: en primer lugar, los valores consenso van de 0 a 100 (al igual que en la representación gráfica), el valor umbral que se toma en consideración para los análisis efectuados está definido a 65, por lo que cada señal o secuencia con un valor por encima del umbral se considera como un sitio aceptor o donador. En segundo lugar, la presencia de una mutación en un sitio de *splicing* condiciona lo siguiente: si el valor asignado a la secuencia o motivo del genotipo silvestre (*wild type*, WT) está sobre el umbral y el valor asignado de variación (entre los genotipos WT y mutante, este valor es desplegado por el programa,) está por debajo de -10% se considera que la mutación rompe o altera el sitio de *splicing* y al contrario, si el valor de la secuencia del genotipo WT está por debajo del umbral y el valor de variación esta sobre 10% se considera que la mutación crea un nuevo sitio de *splicing*.

En la Tabla 18 se presentan nuevamente los motivos que predice el programa, en este caso el cambio recae sobre un posible sitio aceptor de *splicing*, asimismo, se muestran los valores asignados para cada motivo: teniendo un valor de 42.51 y 71.46 para el motivo WT y mutante respectivamente, el porcentaje de variación corresponde a un valor de 68.1%, por lo que de acuerdo a las consideraciones del algoritmo *HSF* se crea un nuevo sitio aceptor de *splicing*. La consecuencia potencial de este evento se traduce en el hecho de que el exón 1 que es el primer exón codificante podría variar su longitud en 12 nucleótidos (+12) si este sitio críptico fuera reconocido por el *spliceosoma* teniendo así una alteración en el marco de lectura del mismo.

Se conocen algunas enfermedades que son consecuencia de mutaciones que provocan la alteración de sitios de *splicing* y la activación de sitios crípticos, por ejemplo, el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) que es un desorden fenotípicamente caracterizado por eventos prematuros de envejecimiento, retardo en el crecimiento postnatal, arteroesclerosis prematura y osteodisplasia.

Las mutaciones que causan HGPS se han identificado en el gen de la lámina nuclear A (LMNA); cerca de 14 mutaciones han sido reportadas, de las cuales 3 se relacionan con alteraciones en el *splicing* de la lámina A (que es una proteína involucrada en la estabilidad de la membrana nuclear) teniendo como consecuencia la producción de proteínas truncadas (p.G608G, p.T623S y IVS11 +1G>A), muchos de los casos de HGPS también son provocados por una mutación puntual de *nov*o en el exón 11 de LMNA: c.1824C>T, la mutación se da en un probable ESE, como resultado, un sitio críptico de *splicing* es activado en transcritos generados de un alelo mutado, el uso del sitio críptico lleva a la producción de una proteína de lámina A truncada faltando al menos 150pb en el exón 11, la proteína truncada es llamada “progerina” y actúa como dominante para generar el fenotipo de pacientes con HGPS.

Por otro lado, en la Figura 32 se muestran los sitios aceptores y donadores cercanos al exón 2; el SNP rs75242405 recae sobre un sitio aceptor potencial de *splicing* (encerrado en un círculo verde), la secuencia que conforma este motivo corresponde a la siguiente: gcccccccttcagAC y la secuencia mutada a gcccccccttcagAT, el análisis de mutación predice la generación de un nuevo sitio ESE cómo se presenta en la Tabla 19.

Para el análisis de los sitios ESE o ESS se deben tener al menos dos algoritmos de predicción distintos o sobrelapados con el mismo resultado, de este modo se puede considerar que un cambio dentro de una secuencia ESS o ESE es relevante. La Tabla 19 muestra los 3 algoritmos de predicción empleados que

establecen la creación de un sitio ESE intrónico: los hexámeros *RESCUE ESE* (consideran que si el motivo de un genotipo WT está presente en la base de datos de este algoritmo y el del genotipo mutante está ausente se asume que este cambio altera algún sitio ESE) y las secuencias *ESR* de Goren y cols. y *EIEs* de Zhang y cols., que al igual que *RESCUE ESE* se definen por las mismas consideraciones incluido lo siguiente: si el motivo del genotipo WT está ausente en la base de datos y el genotipo mutante está presente se asume que la mutación crea un nuevo sitio ESS.

El programa no proporciona más información al respecto, sin embargo se podría inferir que este sitio puede llegar a ser reconocido por proteínas de la familia SR activando nuevos sitios 3' que pueden actuar como sitios aceptores y por lo tanto afectar la longitud del exón 3.

La Figura 33 muestra la ubicación del SNP rs1800547, al igual que en los casos anteriores se realizó el análisis pertinente comparando la secuencia silvestre con la secuencia mutada que posee el cambio encontrado (a → g), no obstante este SNP aparentemente no tiene repercusiones sobre el proceso de *splicing* alternativo del exón 3.

Finalmente, el SNP rs62063845 aparentemente no tiene efecto alguno sobre el proceso de *splicing* del exón 8 (recordar que este exón solo encuentra en isoformas que se expresan en el SNP), no obstante, no se debe descartar que este SNP pueda tener alguna repercusión en este evento.

El SNP rs62063845 recae en el codón ACT que codifica para el aminoácido tirosina y no se encuentra reportado como agente causal de alguna de las enfermedades de interés, pese a esto se evaluó de igual forma que los demás SNPs encontrados.

La presencia de los polimorfismos antes descritos podría impactar la estructura de los exones 1 y 2 de *MAPT* y por ende las isoformas generadas en el SNC. Sin embargo, para poder establecer una alteración a nivel de proteína se deben realizar otros estudios con la finalidad de comprobar los eventos propuestos, el análisis de los niveles de ARNm de *MAPT* del paciente que presentó los cambios en estado homocigoto podría ser de utilidad para evaluar si la proteína tau está afectada.

Diversos reportes en la literatura han establecido que el papel de las mutaciones que impactan el *splicing* ha sido evaluado con un avance relativamente lento ya que es difícil demostrar una clara correlación entre una mutación sospechosa y las enfermedades humanas, es por eso que se han desarrollado metodologías para poder discernir si estos cambios tienen algún efecto a nivel de proteína.

En este punto existen dos términos que comúnmente se utilizan para englobar las diversas metodologías empleadas para tamizar el efecto de una mutación en cuestión: “*wet biology*” o también llamada “biología húmeda” que se refiere al desarrollo y a la mejora de métodos biológicos para caracterizar los efectos de mutaciones en el pre-ARNm y “*dry biology*” o “biología seca” referente al desarrollo de software y herramientas informáticas para predecir si un cambio dado podría interferir con el *splicing* del ARNm.

Hay que recordar que la EA y la DFT se consideran enfermedades multifactoriales y que inclusive no solo un gen puede estar afectado en cada caso ya que diversos genes están implicados y en muchas ocasiones la presencia de proteínas alteradas (tau en estado hiperfosforilado en este caso) puede ser consecuencia de otros eventos celulares.

En el presente trabajo se utilizaron herramientas de biología seca para determinar una posible aproximación o repercusión de los cambios encontrados, dando lugar a evaluar la relación entre el gen *MAPT*, la DFT y particularmente la EA; de

acuerdo a los resultados no se descarta la participación del gen *MAPT* en ambas enfermedades. La ausencia de mutaciones en el exón 10 podría indicar que la patología de las enfermedades estudiadas es debida a otros mecanismos o a la participación de otros genes como se había mencionado anteriormente.

Deberá determinarse si existen mutaciones en los exones restantes del gen y por otro lado analizar los niveles de ARNm con la finalidad de analizar la estructura de las posibles isoformas generadas, también se podrían determinar los niveles de hiperfosforilación de tau para conocer si este proceso al igual que los propuestos, se encuentra afectados y si se dan en etapas tempranas o tardías de la enfermedad.

10. CONCLUSIONES.

No se identificaron mutaciones en ninguno de los exones analizados.

Se identificaron 4 SNPs previamente reportados en bases de datos: el SNP rs62063845 que es un cambio sinónimo para treonina, el SNP rs1800547 y los SNPs rs75242405 y rs17650901 que podrían ser modificadores del *splicing* constitutivo del exón 1 y de *splicing* alternativo del exón 2 del gen *MAPT* y posiblemente generar isoformas alteradas de tau en ambas enfermedades.

11. PERSPECTIVAS.

El análisis directo de transcritos procesados de un paciente es el método más factible para establecer si alguna variación, en particular, en el ADN afecta el proceso de *splicing*. En este caso, se pretende realizar el diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar por medio de RT-PCR las regiones de interés y así evaluar si los SNPs rs17650901 y rs75242405 tienen alguna repercusión sobre el proceso de *splicing* de los exones 1 y 2 del gen *MAPT*.

También se podrían utilizar otros métodos para evaluar la repercusión potencial de los SNPs detectados, por ejemplo, el uso de ensayos in-vitro, la ventaja de este ensayo es que una vez que el templado esté listo, los resultados pueden ser observados en unas horas. Se ha descrito que este sistema tiene como desventaja la limitada cantidad de nucleótidos que se pueden analizar (entre 1000 y 2000), no obstante, en el caso particular se podría mimetizar la región genómica de interés (trascritos que incluyan los exones 1 y 2, tomando en cuenta que la isoforma de mayor tamaño de tau que se expresa en el SNC es de 441 aa, es decir 1323 nucleótidos).

El otro método a utilizar se denomina “sistema de minigenes”; cualquier región genómica de interés como lo es un exón con regiones intrónicas flanqueándolo puede ser amplificado y clonado en un “minigen” utilizando plásmidos como vectores, el plásmido resultante se transfecta temporalmente en una línea celular apropiada donde este debe ser transcrito por la ARN polimerasa II antes de que el pre-ARNm sea procesado en ARNm maduro. El patrón de *splicing* del ARNm se analiza por medio de PCR de retrotranscripción (RT-PCR) con el diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar los transcritos del mini-gen procesado y para evadir la amplificación de plásmidos de ARNm endógenos.

La identificación de mutaciones que potencian el *splicing* también se debe acompañar de la evaluación de la expresividad y penetrancia, para lo cual se requeriría estudiar a las familias completas del paciente afectado, de esta manera se podría determinar la segregación de la mutación y establecer su relación con las manifestaciones clínicas que se observan en estas enfermedades. Conocer el efecto de estas variantes genéticas permitirá profundizar más el conocimiento acerca de los posibles mecanismos implicados en ambas enfermedades y así proporcionar un asesoramiento correcto de los riesgos a los pacientes y sus familiares.

12. BIBLIOGRAFÍA.

- Alberca, R., Montes, E., Gil, E., Mir, P. & Lozano, P. (2002). Enfermedad de Alzheimer y mujer. *Revista de Neurología*, 35(6), 571-579.
- Alonso, A. (2009). Mecanismo de la neurodegeneración inducida por la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer y tautopatías relacionadas. *Alzheimer Realidades e Investigación en Demencia*, 42, 23-31.
- Alonso, M., López, M. & Yescas, P. (2012). Genetics of Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*, 43(8), 622-631.
- Alzheimer's Association. (2014). 2014 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia*, 10(2), 1-80.
- Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739(2-3), 91-103.
- Baker, M., Mackenzie, I., Pickering, M., Gass, J. & Rademakers, R. (2006). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*, 442(7105), 916-919.
- Baralle, D., Lucassen, A. & Buratti, E. (2009). Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice. *EMBO REPORTS*, 10(8), 810-816.
- Barquero, M. & Payno, M. (2007). Enfermedad de Alzheimer. Concepto.Etiopatogenia.Manifestaciones clínicas.Criterios de sospecha. Formas de presentación.Historia Natural.Diagnóstico diferencial. *Medicine*, 9(77), 4928-4935.
- Bird, T. (2010). Genetic Factors in Alzheimer Disease and Dementia. *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*, 681-697.

- Blencowe, B. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends in biochemical sciences*, 25(3), 106-110.
- Brandt, R., Hundelt, M. & Shahani, N. (2005). Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1739(2-3), 331-354.
- Brookmeyer, R., Corrada, M., Curriero, F. & Kawas, C. (2002). Survival following a Diagnosis of Alzheimer. *Archives of Neurology*, 59(11), 1764-1767.
- Buée, L., Bussièrè, T., Buée, S. & Delacourte, A. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 33(1), 95-130.
- Cáceres, J. & Kornblihtt, A. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in genetics*, 18(4), 186-193.
- Caffrey, T. & Wade, M. (2012). The role of MAPT sequence variation in mechanisms of disease susceptibility. *Biochemical Society Transactions*, 40(4), 687-692.
- Caffrey, T., Joachim, C. & Martins, R. (2008). Haplotype-specific expression of the N-terminal exons 2 and 3 at the human MAPT locus. *Neurobiology of aging*, 29(12), 1923-1929.
- Chan, K. D., Reutens, S., Liu, K. D. & Chan, O. R. (2011). Frontotemporal Dementia: Features, diagnosis and management. *Neurology Australian Family Physician*, 40(12), 968-972.
- Cieply, B. & Carstens, R. (2015). Functional roles of alternative splicing factors in human disease. *Wiley Interdisciplinary reviews. RNA*, 6(3), 311-326.

- Clavaguera, F., Grueninger, F. & Tolnay, M. (2014). Intercellular transfer of tau aggregates and spreading of tau pathology: Implications for therapeutic strategies. *Neuropharmacology*, 76, 9-15.
- D'Souza, I. & Schellenber, G. (2005). Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739(2-3), 104-115.
- Doherty, C., Hutchinson, S., Abrahams, S. & Coen, R. (2011). Frontotemporal Dementia. *Neurodegenerativ Disorders*, 115-142.
- Elliott, E., Atlas, R., Lange, A. & Ginzburg, I. (2005). Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism. *The European journal of Neuroscience*, 22(5), 1081-1089.
- Fei, L., Iqbal, G., Iqbal, K. & Gong, C. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1942-1950.
- Feinstein, S. & Wilson, L. (2005). Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739(2-3), 268-279.
- Ferrari, R., Hardy, J. & Momeni, P. (2011). Frontotemporal Dementia: From Mendelian Genetics Towards Genome Wide Association Studies. *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(3), 500-515.
- Gendron, T. & Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 4(13), 1-19.
- Goedert, M., Ghetti, B. & Spillantini, M. (2012). Frontotemporal Dementia: Implications for Understanding Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 1-21.
- Götz, J., Ittner, L. & David, D. (2005). Role of the protein tau in Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, Nervous system*, 2(4), 395-400.

- Gumucio, A., Lannfelt, L. & Nilsson, N. (2013). Lack of exon 10 in the murine tau gene results in mild sensorimotor defects with aging. *BMC Neuroscience*, 14(148), 1-13.
- Harvey, L. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Argentina: Médica Panamericana.
- Herrera, M. & Hernández, M. (2010). Enfermedad de Alzheimer: inmunidad y diagnóstico. *Revista de Neurología*, 51(3), 153-164.
- Hroudová, J., Singh, N. & Fišar, Z. (2014). Mitochondrial Dysfunctions in Neurodegenerative Diseases: Relevance to Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 1-9.
- <http://www.alzforum.org/mutations/search>. (3 de Agosto de 2015).
- Iijima, K., Gatt, A. & Iijima-Ando, K. (2010). Tau Ser262 phosphorylation is critical for A β 42-induced tau toxicity in a transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(15), 2947–2957.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C., Alonso, A. & Iqbal, I. (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 53-69.
- Karch, C., Cruchaga, C. & Goate, A. (2014). Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic. *Neuron*, 83(1), 11-26.
- Ke, S. & Chasin, L. (2011). Context-dependent splicing regulation. Exon definition, co-occurring motif pairs and tissue specificity. *RNA biology*, 8(3), 384-388.
- Kolarova, M., García, S., Bartos, A., Ricny, J. & Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1-13.
- LaFerla, F. & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction. *TRENDS in Molecular Medicine*, 11(4), 170-177.
- Lee, M., Lee, H. & Rubinsztein, D. (2013). Tau degradation: The ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Progress in Neurobiology*, 105, 49-59.

- López, P. (2002). Demencia Frontotemporal. *Alzheimer.Realidades e investigación en demencia*(24), 4-10.
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), 1-25.
- Martin, L., Latypova, X. & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 58(4), 458-471.
- Mattson, M. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(5), 631-639.
- Medeiros, R., Vargas, B. & LaFerla, M. (2011). The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17(5), 514-524.
- Miller, S., Dykes, D. & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.
- National Institutes of Health. (2013). THE DEMENTIAS Hope Through Research. 1-30.
- Neary, D., Snowden, J. & Mann, D. (2005). Frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, 4(11), 771-780.
- Neumann, M., Tolnay, M. & Mackenzie, R. (2009). The molecular basis of frontotemporal dementia. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11(23), 1-22.
- OMS. (2013). Demencia una prioridad de salud pública. 1-112.
- Ostrosky, F. & Gutiérrez, L. (2012). Demencia Frontotemporal: Una revisión. *Revista Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias.*, 12(1), 189-202.
- Pittman, A., Fung, H. & Silva, R. (2006). Untangling the tau gene association with neurodegenerative disorders. *Human Molecular Genetics*, 15(2), 188-195.

- Pooler, A., Noble, W. & Hanger, D. (2013). A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology*, 76(Pt A), 1-8.
- Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A. & Niewiadomska, G. (2014,). Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 4671-4713.
- Qian, W. & Liu, F. (2014). Regulation of alternative splicing of tau exon 10. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 1-12.
- Qing, B. & Burton, E. (2011). Zebrafish models of Tauopathy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(3), 353-363.
- Roberson, E. (2006). Frontotemporal Dementia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 6, 481-489.
- Rodgers, A. (2005). Alzheimer's disease Unraveling the mystery. *National Institute of Aging*, 1-80.
- Rohrer, J. & Zetterberg, H. (2014). Biomarkers in frontotemporal dementia. *Biomarkers in Medicine*, 8(4), 519-521.
- Seelaar, H., Kamphorst, W., Rosso, S. & Azmani, A. (2008). Distinct genetic forms of frontotemporal dementia. *Neurology*, 71(16), 1220-1226.
- Seelaar, H., Rohrer, J., Pijnenburg, Y., Fox, N. & van Swieten, J. (2011). Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *Journal of Neurology , neurosurgery, and psychiatry*, 82(5), 476-486.
- Selkoe, D. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 81(2), 741-766.
- Shen, L., Bagyinszky, E., Chul, Y., Soo A. An, S. & SangYun, K. (2013). Genetic Factors in Frontotemporal Dementia: A review. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 5(3), 113-130.
- Snowden, J., Naery, D. & David, M. (2002). Frontotemporal Dementia. *The British Journal of Psychiatry*, 180(2), 140-143.

- Spillantini, M. & Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, 21(10), 428-433.
- Spillantini, M. & Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, 12(6), 609-622.
- Stockley, J. & Neill'O, C. (2007). The proteins BACE1 and BACE2 and β -secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Biochemical Society Transactions*, 35(3), 574-576.
- Tazi, J., Bakkour, N. & Stamm, S. (2009). Alternative splicing and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(1), 14-26.
- Viadero, F., Rodríguez, R. & Combarros, P. (2013). Genética y enfermedad de Alzheimer: población en riesgo. *Revista Española de Geriátria y Gerontología*, 40(1), 39-44.
- Wang, G. & Cooper, T. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews Genetics*, 8(10), 749-761.
- Wang, J., Grundke, I. & Iqbal, K. (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 59-68.
- Wang, J., Xia, Y., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2013). Abnormal Hyperphosphorylation of Tau: Sites, Regulation, and Molecular Mechanism of Neurofibrillary Degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(1), 123-129.
- Wang, Y., Liu, J., Huang, B., Xu, Y., Li, J., Huang, L. & Wang, X. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation (Review). *Biomedical Reports*, 3(2), 152-158.
- Wang, Z. & Burge, C. (2008). Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, 15(4), 802-813.

- Wszolek, Z., Tsuboi, Y., Ghetti, B., Pickering, S., Baba, Y. & Cheshire, W. (2006). Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1(30), 1-6.
- Xiao-dong, P. & Xiao-chun, C. (2013). Clinic, neuropathology and molecular genetics of frontotemporal dementia: a mini-review. *Translational Neurodegeneration*, 2(8), 1-9.
- Xin Gong, C., Grundke, I. & Iqbal, K. (2010). Targeting Tau Protein in Alzheimer's Disease. *Drugs Aging*, 27(5), 351-365.
- Zanetti, O., Solerte, S. & Cantoni, F. (2009). Life Expectancy in Alzheimer's Disease (AD). *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 49(Supplement), 237-243.