



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ANÁLISIS DEL GEN *FUS* EN PACIENTES CON DEMENCIA
FRONTOTEMPORAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

JESSICA NAVA VALDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ

Los Reyes Iztacala, Estado de México 2017





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.



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT N° 026211)

Datos sinodales

- 1. Dr. Sergio Vaca**
- 2. Dra. Martha Ofelia Salcedo**
- 3. Dra. Petra Yescas Gómez**
- 4. Dr. Felipe Vaca Paniagua**
- 5. M. en C. Irma Elena Dueñas García**

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
1. Demencia frontotemporal.....	11
1.1 Impacto global de la demencia.....	13
1.2 Epidemiología de la DFT.....	14
1.3 Prevalencia.....	15
2. Clasificación de la DFT.....	16
2.1 Características clínicas.....	16
2.2 Variante conductual de la DFT.....	16
2.3 Demencia semántica.....	18
2.4 Afasia progresiva no fluente.....	18
2.5 Factores de riesgo.....	19
3. Características histopatológicas.....	20
3.1 Inclusiones proteicas.....	20
3.1.1 DFT-tau.....	20
3.1.2 Ubiquitinopatías.....	21
3.1.2.1 DFT-FUS.....	22
4. Genómica funcional de la demencia frontotemporal.....	22
4.1 El gen FUS.....	24
4.2 FUS, como parte de la familia de proteínas FET.....	25
4.2.1 Variantes génicas relacionadas con FUS.....	28
4.2.2 Funciones fisiológicas de FUS.....	31

4.2.2.1 Transcripción de FUS.....	31
4.2.2.2 <i>Splicing</i> pre-mRNNA.....	33
4.2.2.3 Respuesta a daño de DNA.....	34
4.2.2.4 Procesamiento de miRNA.....	34
4.2.2.5 Transporte y traducción de mRNA.....	34
5. Mecanismo y patología de la DFT.....	35
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.....	37
1. Hipótesis.....	37
OBJETIVO.....	37
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
1. Población de estudio.....	38
2. Extracción de DNA.....	39
3. Cuantificación de DNA.....	41
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
5. Reacción de secuenciación.....	45
RESULTADOS.....	48
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	59
PERSPECTIVAS.....	59
REFERENCIAS.....	60

ABREVIATURAS

aa aminoácidos

APC Gen de la poliposis adenomatosa familiar

APNF Afasia progresiva no fluente

ApoE Apolipoproteína E

CHMP2B Proteína multivesicular

C9orf72 Hexanucleótido repetido del cromosoma 9 en marco de lectura abierto 72

C-ter Extremo carboxilo-terminal

DFT Demencia frontotemporal

DFT-FUS Demencia frontotemporal con inclusiones de FUS

DFT-tau Demencia frontotemporal con inclusiones de tau

DFT-TDP Demencia frontotemporal con inclusiones de TDP-43

DFT-U Demencia frontotemporal con inclusiones de ubiquitina

DFTL Demencia frontotemporal lobar

DFTvc Variante conductual de la demencia frontotemporal

DS Demencia semántica

DZ Motivos de dedos de zinc

EA Enfermedad de Alzheimer

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

ELA Esclerosis lateral amiotrófica

EP Enfermedad de Parkinson

EWSR1 Gen que codifica la proteína EWS

FET Familia de proteínas que incluyen FUS, EWSR1 y TAF15,

FUS Proteína fusionada en sarcoma

GRN Gen de la progranulina

hnRNP Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares

MAPT Proteína de asociación a microtubulos tau

NLS Señal de localización nuclear

Nd1-L La proteína de la familia Kelch

N-ter Extremo amino-terminal

OPT Gen que codifica para la optineurina

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PSP Parálisis supranuclear progresivo

RBP Ribonucleoproteína

RRM Motivo de reconocimiento de RNA

SDS Dodecil sulfato de sodio

SEN Señal de exportación nuclear

SLN Señal de localización nuclear

SQTM1 Gen que codifica para la proteína sequestosoma 1

SOD1 Gen de la proteína superóxido dismutasa 1

TAF15 Proteína de unión a la caja TATA asociada al factor 15

TCE Traumatismo craneoencefálico

TDP-43 Proteína TAR-43 de unión a DNA

U7 snRNP Complejo de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares

UBQLN2 Gen que codifica para la proteína Ubiquilina 2

VCP Gen que codifica para la proteína que contiene valosina

RESUMEN

Actualmente, vivimos en sociedades que están tratando de solucionar los problemas que aquejan a la población adulta mayor, éstos están cada vez más alejados de la productividad y éxito de la vida cotidiana. Lo anterior contribuye de alguna manera para que sean más frecuentes las enfermedades. Las enfermedades de tipo mental, se sitúan como un problema de salud pública que requiere de atención prioritaria. La demencia es un término amplio que se aplica a un síndrome heterogéneo que abarca más de 100 enfermedades que afectan el cerebro, y que generalmente aparecen la sexta década de la vida. La demencia frontotemporal (DFT) se caracteriza principalmente por deterioro progresivo en el comportamiento, personalidad y/o habilidades de lenguaje, con preservación relativa de la memoria. A la fecha, la identificación de los biomarcadores moleculares, permiten evaluar tempranamente los procesos biológicos que llevan al desarrollo de las demencias. Por lo anterior, es importante la identificación de variantes genéticas en pacientes mexicanos, lo que puede contribuir a entender mejor los mecanismos que la ocasionan en nuestra población, así como el desarrollo de la enfermedad y la posible detección a tiempo, para mejorar la calidad de vida de los pacientes con tratamientos adecuados. El conocimiento sobre el impacto de las ribonucleoproteínas (RBPs) en la intervención de procesos de la DFT, así como las mutaciones en estas proteínas de unión a RNA como lo es la proteína fusionada en sarcoma (*FUS*), se ha asociado como una causa de diversas enfermedades neurodegenerativas y se han encontrado al menos un 5% de los casos de DFT. Esta proteína interviene en múltiples etapas de procesamiento y

metabolismo del RNA, así como en daño a DNA, transcripción y proliferación celular. El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de mutaciones y/o polimorfismos en los exones 5, 6, 14 y 15 del gen *FUS* mediante secuenciación tipo Sanger, para lo cual se analizaron a 52 pacientes con diagnóstico clínico de probable DFT. Ninguno de los casos estudiados presentó mutaciones ni polimorfismos en los exones analizados, lo que no descarta la participación de este gen. Se requiere completar el estudio del mismo, ya que los cambios pueden darse a otro nivel, como sería, de RNA o proteína. Es necesaria una mayor profundización en la arquitectura genética de esta patología, ya que puede contribuir a mejorar el diagnóstico clínico, y contribuir a la búsqueda de nuevos marcadores genéticos, que nos permitan detectarla en etapas más tempranas y/o en un futuro crear nuevas dianas terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

Las proyecciones demográficas para América Latina y el Caribe indican que para 2025 el porcentaje de personas mayores de 60 años se incrementará de 8 a 14%. A la par con la disminución en la tasa de mortalidad se observa un incremento de padecimientos neurodegenerativos, entre los cuales sobresalen las demencias. Hay casi 900 millones de personas mayores de 60 años y más que viven en todo el mundo, y el aumento de la esperanza de vida contribuye rápidamente al incremento de este número y se asocia con el aumento de la prevalencia de las enfermedades degenerativas. En 2015 había aproximadamente 46.8 millones de personas afectadas por demencia en todo el mundo y se estima que este número se duplicará cada 20 años, llegando a 74.7 millones en 2030 y 131.5 millones en 2050 (Asociación Mundial de Alzheimer, 2015), dicho incremento será más marcado para países en desarrollo (300%) en comparación con países desarrollados (100%) (Agudelo *et al.*, 2011). En México, un país en desarrollo, la demencia se sitúa como un problema de salud pública que requiere de atención prioritaria, esto demanda que se fortalezca el conocimiento de las demencias, para mejorar el diagnóstico y tratamiento de las mismas.

1. Demencia frontotemporal

La demencia frontotemporal (DFT) es un término patológico utilizado para la descripción clínica, patológica y genética de un grupo de desórdenes heterogéneos, donde la degeneración selectiva de los lóbulos frontotemporal y temporales es una característica prominente y común. Es la segunda forma más común de demencia, después de la enfermedad de Alzheimer (EA) en individuos menores a 65 años (Ratnavalli *et al.*, 2002). Los síntomas aparecen alrededor de la quinta o sexta década de la vida y esta condición tiene un curso de evolución de 5 a 10 años, que causa gradualmente alteraciones significativas en la esfera social y ocupacional, para terminar con la muerte del paciente (Ostrosky, 2012).

La perspectiva histórica del estudio de la DFT se ha distinguido por el interés de definirla como una entidad independiente de otras patologías similares, especialmente de la EA de la cual en un inicio fue considerada como una variante (Toribio-Díaz, 2008).

En 1892, el neuropsiquiatra checo Arnold Pick, presentó por primera vez una serie de casos con deterioro progresivo del lenguaje, y durante muchos años el término "*demencia frontotemporal*" se utilizó como sinónimo de la enfermedad de Pick. Sin embargo, la enfermedad de Pick es ahora reconocida como una forma de DFT y se refiere al diagnóstico patológico específico, donde las inclusiones proteicas tau-positivas están presentes (Chan *et al.*, 2011).

Hasta la fecha, la clasificación clínica de la DFT ha evolucionado hasta abarcar al menos tres subtipos principales, cuya característica común es la atrofia relativamente limitada a los lóbulos frontales o temporales (Mckhann *et al.*, 2001) que son: -la variante conductual de la DFT (DFTvc) con afectación principal del lóbulo frontal (especialmente de la región prefrontal) y otros dos con predominio de deficiencias en el área del lenguaje -afasia progresiva no fluente (APNF) y -la demencia semántica (DS), ambas con afectación predominantemente del lóbulo temporal. La DFT se refiere entonces a un grupo de enfermedades neurodegenerativas muy heterogéneo tanto por sus características clínicas, como histopatológicas y genéticas.

La DFT es un trastorno altamente heredable con aproximadamente del 30-50% de los casos con antecedentes familiares positivos, y los factores genéticos en esta patología son de gran importancia. Principalmente, las mutaciones en tres genes: la proteína tau asociada a microtúbulos (*MAPT*), progranulina (*GRN*) y el hexanucleótido repetido del cromosoma 9 en el marco de lectura abierto 72 (*C9orf72*) son responsables de la mayoría de los casos familiares, y alrededor del 10-20% de todos los casos con DFT (Rohrer *et al.* 2009), en los que se profundizará más adelante. No obstante, la agregación neuronal y la disfunción proteica son la clave de la caracterización neuropatológica de la DFT.

La DFT también se puede clasificar con base en los hallazgos neuropatológicos, y se reconocen tres subgrupos principales, que se caracterizan por inclusiones proteicas específicas: (1) inclusiones tau (DFT-tau); (2) inclusiones asociadas a la proteína fijadora de DNA TAR-43 (TDP-43) (DFT-TDP) y; (3) la proteína de fusión en sarcoma (FUS) (DFT-FUS) (Rohrer *et al.* 2009), que se discutirán más adelante.

1.2 Impacto global de la demencia

De acuerdo al reporte de 2015 de la Asociación Mundial de Alzheimer, se ha estimado un total de 9.9 millones de nuevos casos de demencia a nivel mundial. Hay cerca de 900 millones de personas mayores de 60 años y más que viven en todo el mundo. Por otra parte, la disminución en la tasa de mortalidad en esta población de adultos mayores ha permitido un aumento de padecimientos neurodegenerativos, entre los cuales destacan las demencias. Entre 2015 y 2050, el número de personas en edad avanzada que viven en países de mayores ingresos se prevé aumentar con solo el 56%, en comparación con el 138% en los países de medios ingresos, el 185% en países de clase media baja, y por 239% en países de bajos ingresos (Reporte Mundial de Alzheimer, 2015).

El porcentaje de personas mayores de 60 años estimado para 2025 en América Latina tendrá un aumento del 8 a 14% (Agudelo *et al.*, 2011). Los países más pobres cuentan con menos recursos profesionales, humanos y económicos para cubrir las necesidades sanitarias y sociales de sus poblaciones de adultos mayores. Muchos de estos países afrontan altas tasas de enfermedades maternas, infantiles e infecciosas, combinadas con una pandemia creciente de enfermedades crónicas no contagiosas, como lo es la demencia. Incluso los países con un crecimiento económico y rápido desarrollo en Asia y América Latina tienen problemas para establecer sistemas integrales y eficaces de protección social para las personas de edad avanzada, sin poder garantizar unos ingresos dignos y acceso universal a la asistencia sanitaria y social, siendo los adultos mayores los que menos se benefician directamente del desarrollo económico. (Reporte Mundial de Alzheimer, 2015).

1.3 Epidemiología de la DFT

Se estima que esta patología afecta aproximadamente de 15 a 22 individuos por cada 100,000 habitantes y tiene una incidencia de 3.5-4.1 por 100,000/año en el grupo de edad de 45 a 64 años, los estudios poblacionales indican una distribución homogénea de género. No obstante, el 25% de los casos de DFT se presenta en edad avanzada (Chan *et al.*, 2011). Los pacientes tienen una esperanza de vida de seis años a partir de la aparición de los síntomas (Mercy, 2008). A pesar de que el inicio es típicamente en la sexta década de la vida, puede iniciar tempranamente como en la tercera década o tardíamente como en la novena década de vida (Warren, 2013), y se ha pensado que la prevalencia de la DFT en grupos de mayor edad se encuentra subestimada. Sin embargo, este grupo de enfermedades tiene un gran impacto como causa de demencia de inicio temprano y se deben considerar todos los costos socioeconómicos y humanos que conlleva este tipo de padecimiento dada su larga evolución.

La atención de la DFT en la población es difícil y costosa debido a que la frecuencia de la enfermedad en nuestra población se desconoce y de acuerdo a los estudios reportados en los últimos años parece ser más frecuente, lo que predispone a la población en situación de riesgo, por lo anterior se debe fortalecer el conocimiento de las demencias para mejorar el diagnóstico, que se basa principalmente en el dominio de la experiencia clínica e histopatológica (Knopman y Roberts, 2011).

En la última década, se han llevado a cabo diversos estudios que han acumulado datos de prevalencia e incidencia a partir de estudios poblacionales realizados en Canadá, Japón, Italia, el Reino Unido, los Países Bajos, España, y los Estados Unidos. Se observa que todos, se llevaron a cabo en Europa o América del Norte, utilizando muestras en las que más del 95% son de raza caucásica (Chiadi y Diehl-Schmid, 2013) , y por lo tanto insuficiente para representar a las poblaciones no caucásicas; desde una perspectiva antropológica, los mexicanos son el resultado de una mezcla sustancial de un sustrato de amerindios con una mezcla importante europea, así como localmente mezcla africana, que los excluye de los caucásicos, pese a ello, cuentan con descendencia caucásica.

1.4 Prevalencia

Se estima que 46.8 millones de personas en todo el mundo viven con demencia a partir del 2015. Este número se duplicará cada 20 años, llegando a 74.7 millones en 2030 y 131.5 millones en 2050. Aproximadamente el 58% de las personas con demencia viven actualmente en países clasificados por el World Bank como países de bajos a medianos ingresos, entre los que se encuentra México, y de acuerdo a estas cifras la proporción de casos se incrementará a 63% en 2030 y 68% en 2050.

La distribución regional actual de nuevos casos de demencia es de 4.9 millones (49% del total) en Asia, 2.5 millones (25%) en Europa, 1.7 millones (18%) en América y 0.8 millones (8%) en África. En comparación con 2012, año en que la proporción de nuevos casos representó un aumento en Asia, África y América, mientras que la proporción de casos en Europa ha decaído.

La DFT es tan común como la EA, en un estudio realizado con población holandesa, se estimó que la prevalencia en un rango de 45 a 65 años de edad, es del 7 al 15% comparado con el 35% por cada 100,00 habitantes en la EA. Mientras que, en personas mayores de 75 años, la prevalencia de DFT es del 3% (Ostrosky 2012; Ostrosky *et al.*, 2008).

La incidencia de la demencia aumenta exponencialmente al aumentar la edad. Los diversos estudios han demostrado que la incidencia de la demencia se duplica cada 6,3 años que aumenta la edad, del 3.9 por 1,000 personas/año con 60-64 años de edad y de 104.8 por 1000 personas/año en sujetos mayores de 90 años. El número de nuevos casos aumenta y disminuye al aumentar la edad en cada región. En Europa y América el pico de incidencia está entre los 80-90 años, en Asia entre los 75-84 años, y en África entre los 65-74 años. En estudios post-mortem la frecuencia de la DFT se ha estimado del 3 al 10%, mientras que en muestras clínicas de pacientes en los que se sospechaba de esta demencia, se detectó en un 3.2% (Sjögren y Andersen, 2006; Ostrosky, 2012).

Sin embargo, en la última década la mayoría de los estudios de prevalencia e incidencia que se han llevado a cabo, se han realizado a partir de estudios de población en Canadá, Japón, Italia, los Países Bajos, España, Reino Unido y Estados Unidos (Chiadi, 2013), excluyendo a América Latina.

Clasificación de la DFT

2.1 Características clínicas: síndromes de la DFT

Hay tres principales síndromes clínicos de DFT, que se definen de acuerdo con la base de las características más importantes que presentan. Alrededor de la mitad de los casos presentan cambios en el comportamiento (variante conductual de la DFT), y los demás presentan una falla en el lenguaje (afasia progresiva primaria) caracterizada ya sea por alteración de la producción del habla (afasia progresiva no fluente) o por alteración de la comprensión de la palabra y memoria semántica (es decir, la memoria de sentido) (demencia semántica) (Doherty *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se resumen las características clínicas que presentan cada una de estas variantes.

2.2 Variante conductual de la DFT (DFTvc)

Éste síndrome se caracteriza por la disminución progresiva en las habilidades interpersonales y ejecutivas, con respuesta emocional alterada y una variedad emergente de comportamientos anormales que incluyen la apatía, desinhibición, obsesiones, rituales y estereotipos. Las funciones corticales posteriores y de

TABLA 1 | Variantes de la DFT.

		Variante	Afectación	Características clínicas
DFT	Variante conductual	Variante conductual de la DFT (DFT vc)	Lóbulo frontal (especialmente región prefrontal)	Disfunción ejecutiva, apatía, apetito anormal, desinhibición, comportamiento obsesivo compulsivo.
	Variante de afasia Progresiva	Afasia progresiva no fluente (APNF)	Lóbulo temporal izquierdo	Agramatismo y/o apraxia del habla.
		Demencia semántica (DM)	Lóbulo temporal derecho	Alteración en comprensión de palabras, deterioro semántico no verbal.

Región de afectación y características clínicas principales que presentan. (Tomado de Lashley, 2015).

memoria no se ven afectadas y el rendimiento en las pruebas psicométricas se ve notablemente preservado. Hay una escasez de signos neurológicos asociados, aunque reflejos primitivos (forzados), ésta variante puede estar asociada a neuronas extrapiramidales o con neuronas motoras como parte de una superposición de este síndrome (Warren, 2013).

2.3 Demencia semántica (DM)

Este síndrome se caracteriza por la degradación progresiva de la memoria semántica (el sistema de memoria que almacena el conocimiento sobre objetos, y conceptos basados en la experiencia individual acumulada). Típicamente la demencia semántica afecta inicialmente al alto sistema de conocimiento del cerebro que media el vocabulario, es decir, el conocimiento del significado de las palabras. En el curso temprano de la enfermedad, el déficit semántico puede ser bien compensado y puede surgir únicamente en las pruebas de conocimiento especializado con anterioridad a la orden del paciente. Un deterioro semántico más penetrante que afecta también la información visual (el reconocimiento de los rostros familiares, o prosopagnosia) o de objetos visuales (agnosia visual) y otros dominios no-verbales como los sabores y olores presentes durante el curso de la enfermedad, así como el comportamiento perturbador similar a la DFTvc. La atrofia se presenta principalmente en el lado izquierdo, pero puede presentarse del lado derecho en los casos dirigidos por déficits no verbales, con el tiempo se vuelve más posterior y afecta la corteza temporal y frontal inferior (Hodges, 2007; Lashley, 2015).

2.4 Afasia progresiva no fluente (APNF)

Este síndrome se caracteriza por un deterioro progresivo de emisión del lenguaje de forma no fluida con esfuerzo. Varios síndromes neurolingüísticos se encuentran dentro de la categoría general de afasia progresiva no-fluente. En algunos pacientes, presentan errores en el sonido del habla (fonética) o apraxia del habla

como característica principal; mientras en otros el síndrome es dominado por el agramatismo expresivo con frases telegráficas. La atrofia es dominante en el lóbulo temporal izquierdo. Este síndrome ocurre en un 25% de los casos de DFT (Rohrer, 2011; Lashley, 2015).

La evolución de esta enfermedad depende mucho del subtipo clínico y de si existe alguna otra patología relacionada. Se ha observado que durante el curso de la enfermedad, los tres subtipos de DFT pueden empalmarse, ya que un paciente puede cumplir criterios para un diagnóstico y con el tiempo cumplir criterio para otro, del mismo modo, hay trastornos neurológicos que se pueden presentar junto con la DFT como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de parkinson (EP), la demencia corticobasal (DCB), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la enfermedad de la neurona motora (ENM) (Ostrosky, 2012).

2.5 Factores de riesgo

En cuanto a los factores de riesgo, se ha reportado que hasta un 40% de los pacientes puede presentar una historia familiar positiva de demencia de inicio temprano, por lo que se han identificado familias con herencia autosómica dominante de esta enfermedad, a partir de las cuales se han reconocido diferentes genes causales. Por otro lado, al rededor del 60% de los pacientes con DFT que no presentan una historia familiar positiva, son reportados como casos esporádicos. Los factores genéticos tales como el alelo expandido de ApoE (apolipoproteína E) y el haplotipo H1 del gen *MAPT*, han sido asociados con algunos casos esporádicos de la enfermedad (Fabre, 2001).

A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas que, si presentan factores de riesgo como son la EA, la EP y la PSP, la DFT no ha reportado factores de riesgo no genéticos definidos hasta el momento. A pesar de ello, algunos estudios han señalado que posibles factores de riesgo ambientales y médicos como un traumatismo craneoencefálico (TCE) previo, la existencia de enfermedad tiroidea

(Rosso *et al.*, 2003) o algún trastorno psiquiátrico previo, incrementan el riesgo de presentar DFT.

3. Características histopatológicas

3.1 Inclusiones proteicas

Este grupo de enfermedades es heterogéneo, clínicamente y con base en las inclusiones o hallazgos histopatológicos se le conoce como degeneración lobar frontotemporal (DFTL). La mayoría de los casos de DFTL presentan una acumulación anormal intracelular de proteínas específicas para esta enfermedad. Inicialmente, solo en el subgrupo de DFTL caracterizado por la agregación de la proteína tau hiperfosforilada en neuronas y glia, clasificada como DFT-tau, fue descrita. Sin embargo, otras principales proteínas patológicas han sido implicadas en la DFT; existen casos observados en series de autopsias con inclusiones celulares que contienen predominantemente tau fosforilada y la proteína de unión a DNA-43 (TDP-43), mientras que una minoría presenta inclusiones que contienen a la proteína fusionada en sarcoma (FUS) (Mackenzie *et al.*, 2012). La naturaleza de las inclusiones ubiquitina-positivas se han identificado en un cuarto grupo, y actualmente es clasificado como DFT-UPS.

En la Figura 1 se resume la clasificación patológica de la DFT basada en las características moleculares de la enfermedad.

3.1.1 DFT-tau

En aproximadamente el 40-50% de todos los casos de DLFT la proteína tau asociada a microtúbulos forma inclusiones en las neuronas como en células gliales (tanto astrocitos y oligodendrocitos), en este tipo de inclusiones la proteína tau está hiperfosforilada. En esos casos, el cuadro clínico, se caracteriza por la afectación de las funciones visuoespaciales. Una pequeña parte de estos casos tau-

negativos tienen inclusiones neuronales, que originalmente se identificaron por su inmunoreactividad para ubiquitina (DFT-U), en los que se ha presentado afectación del comportamiento y lenguaje (Josephs *et al.*, 2004; Mackenzie, *et al.*, 2006).

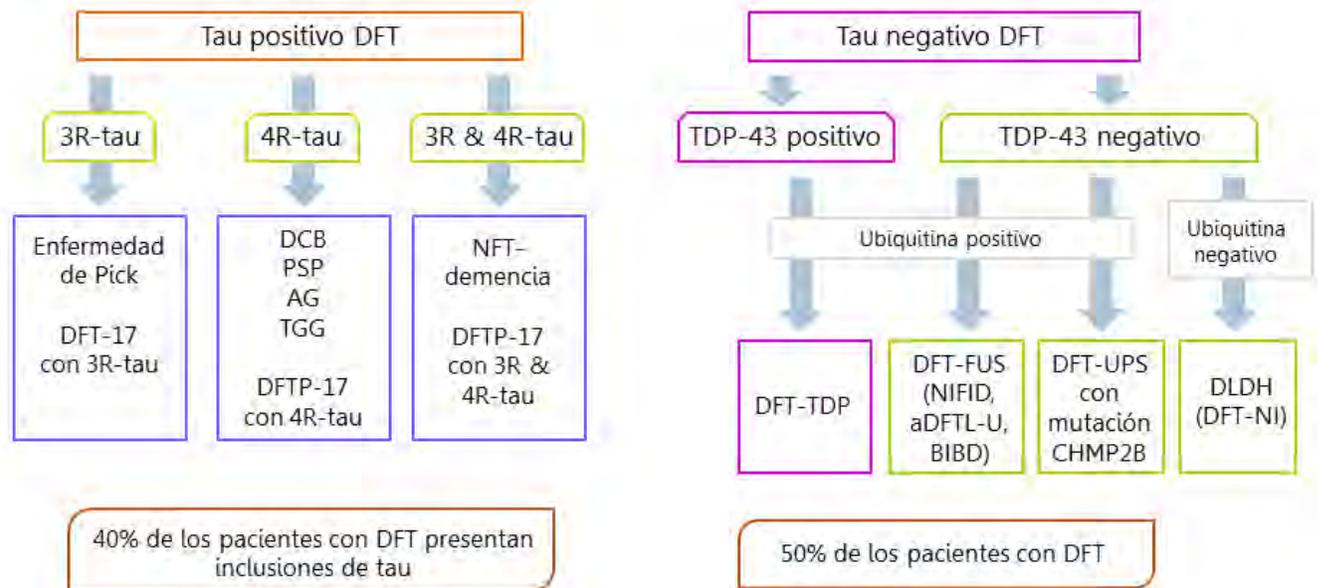


FIGURA 1 | Clasificación basada en los hallazgos histopatológicos de la DFT. Esta clasificación se basa en las características moleculares asociadas a la enfermedad, inclusiones proteicas, fenotipos morfológicos e información genética. 3R-tau, tres repetidos de tau; 4R cuatro repetidos de tau; aDFT-U, DFT atípica con inclusiones neuronales de ubiquitina inmunoreactiva; BIBD, enfermedad con inclusiones de cuerpos basofílicos; DCB, degeneración corticobasal; DLDH, demencia carente de histología distinta; DFT-17, DFT y parkinsonismo ligada al cromosoma 17; TGG taupatía glial; NFT-demencia, demencia con marañas neurofibrilares; NIFID, enfermedad por inclusión de filamentos intermedios. (Tomado y modificado de Lashley *et al.*, 2015; Ostrosky, 2012; Goedert, 2012).

3.1.2 Ubiquitinopatías (DFT-U)

La mayoría de los casos de DFTL no están asociados con una patología tau, sino que se caracterizan por inclusiones neuronales ubiquitina-positivas, denominadas DFT-U. El 50% de los pacientes presentan este tipo de inclusiones de ubiquitina, y hay principalmente síntomas extrapiramidales. La mayoría de estos casos está asociada a la acumulación de TDP-43 (DFT-TDP). Recientemente, la localización anormal de la proteína FUS ha sido descrita como un componente de las inclusiones

en varios subtipos de DFTL, y que a su vez son responsables de la mayoría de casos de DFT negativos para tau y TDP-43, ahora incluidos en el grupo DFT-FUS.

3.1.2.1 DFT-FUS

Este grupo incluye muestras con inclusiones ubiquitina-positivas (DFT-U), y son responsables de la mayoría de casos de DFT negativos para tau y TDP-43, que representan aproximadamente del 5-10% de casos para DFT-U positivos. El conjunto representa menos del 10%, e incluye tres enfermedades, por cuerpos de inclusión de neurofilamentos (NIFID), DFT-T atípica (aDFT-T) y la enfermedad de inclusiones de cuerpos basófilicos (BIBD) (Neumann, *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010).

Solamente pocas mutaciones han sido reportadas en pacientes con fenotipo DFTL o DFTL-ELA, sin embargo, estudios adicionales en cohortes de DFTL no mostraron mutaciones, lo que sugiere que FUS tiene solo un papel limitado en la etiología genética de DFTL. Asimismo, la acumulación anormal de las 3 proteínas FET (EWS, TAF15 y FUS) en inclusiones patológicas se han descrito en todos los subtipos de DFTL-FUS.

El tratamiento es en gran parte sintomático, pero el progreso en la clasificación patológica, molecular y genética de FTD continúa creciendo, lo que conduce a las posibilidades de modificación de la enfermedad (Doherty *et al.*, 2011).

4. Genómica funcional de la DFT

Las bases moleculares de la DFT son heterogéneas, llevando a la variabilidad del fenotipo. A pesar de que la mayoría de los casos se consideran esporádicos, la DFTL muestra un fuerte compuesto genético, con una historia familiar en aproximadamente el 40% de casos, y un patrón autosómico dominante se observa en el 25-50% de estos pacientes (Seelaar *et al.*, 2008).

Los factores genéticos están involucrados en la mayoría de los pacientes, el estudio molecular en estos ha permitido la identificación de 10 genes que al estar mutados, llevan al desarrollo de la DFT: la proteína de asociación a microtúbulos tau (*MAPT*), gen de la progranulina (*GRN*), gen codificante para proteína multivesicular (*CHMP2B*), el hexanucleótido repetido del cromosoma 9 en el marco de lectura abierto 72 (*C9Orf72*), gen que codifica para la proteína que contiene valosina (*VCP*), el gen que codifica para la proteína de unión a ubiquitina p62 (*SQTM1*), el gen que codifica para la proteína ubiquilina-2 (*UBQLN2*), el gen que codifica para la optineurina (*OPTN*), gen de la proteína TAR-43 de unión a DNA (*TARDBP*) y el gen de la proteína fusionada en sarcoma (*FUS*) (Goedert, *et al.*, 2012; Ferrari, 2013). En la tabla 2 se muestran los genes identificados a la actualidad, tanto en la DFT, como en el espectro de DFT, el tipo de variantes que están presentes en los distintos fenotipos clínicos, tipo de patología (inclusiones proteicas) y el tipo de asociación.

Un estudio enfocado en los niveles de expresión y patrones en las cortezas frontal y temporal revelaron que los genes *MAPT*, *UBQLN2*, *VCP*, *TARDBP*, *CHMP2B* y *FUS* tenían alta tasas de expresión (Ferrari, 2016), en comparación con el resto de genes que están presentes en la DFT.

A pesar de que ahora conocemos la identidad de distintos genes involucrados en la enfermedad, notablemente *MAPT*, *GRN*, y *C9Orf72*, el rango completo de las determinantes genéticas de la DFT es aún muy desconocido.

TABLA 2 | Genes relacionados con la DFT.

	Genes	Tipo de variante	Fenotipo clínico	Patología	Tipo de asociación
genes-DFT	<i>MAPT</i>	mutaciones puntuales exón/intron	DFTc, DFT-17	DFT-Tau	mendeliana
		indel corto/largo			
		sin sentido			

TABLA 2 | Continuación.

	Genes	Tipo de variante	Fenotipo clínico	Patología	Tipo de asociación
genes- DFT	<i>GRN</i>	<i>sin sentido</i>	DFT vc, APNF	DFT-TDP	
		con cambio de sentido			
		corrimiento de marco de lectura			
		deleciones largas			
	<i>CHMP2B</i>	sin sentido	DFT3	DFT-UPS	
		con cambio de sentido			
espectro- DFT	<i>C9orf72</i>	Expansión	ELA; ELA/DFT	DFT-TDP	Mendeliana
	<i>VCP</i>	con cambio de sentido	ELA; DFT	DFT-TDP	
	<i>SQSTM1</i>	sin sentido	ELA-DFT	DFT-TDP	
		con cambio de sentido			
	<i>UBQUN2</i>	sin sentido	ELA; DFT	DFT-TDP	
		con cambio de sentido			
	<i>OPTN</i>	sin sentido	ELA/DFT	DFT-TDP	
		sin sentido			
	<i>TARDBP</i>	sin sentido	ELA; ELA/DFT	DFT-TDP	
	<i>FUS</i>	sin sentido	ELA; ELA/DFT	DFT-FUS	
corrimiento de marco de lectura					
Indel					

4.1 El gen FUS (fusionado en sarcoma)

La participación de FUS en las enfermedades neurodegenerativas se inició en 2009 como componente principal de los agregados característicos en neuronas afectadas en ELA familiar y casos de DFT esporádicos (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance, *et al.*, 2009). Más tarde, se describió que el gen *FUS* presenta diferentes niveles de expresión en el cerebro durante el desarrollo y el envejecimiento, y niveles

excepcionalmente altos en el cerebelo en comparación con otros tejidos (Ferrari, 2016), razón por la cuál es importante su estudio en estas enfermedades neurodegenerativas.

El gen *FUS* está localizado en la región cromosómica 16p11.2. (Figura 2), comprende un total de 15 exones, y codifica para la proteína FUS, que presenta una longitud de 526 aa. Este gen forma parte del complejo multifuncional proteico de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) (Deng, 2014), que contienen RNA heterogéneo nuclear (hnRNA), y son estabilizadoras, es decir, su función radica en asociarse al pre-mRNA para impedir la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases, de ésta manera el pre-mRNA permanece accesible para interactuar con otras moléculas; este complejo también está involucrado en el *splicing* (corte y empalme de exones) de pre-mRNA, y la exportación del mRNA procesado al citoplasma. Considerando lo anterior, es importante mencionar que se ha observado que el resultado de variantes en el *splicing* alternativo en este gen, derivan en DFT (García *et al.*, 2007).

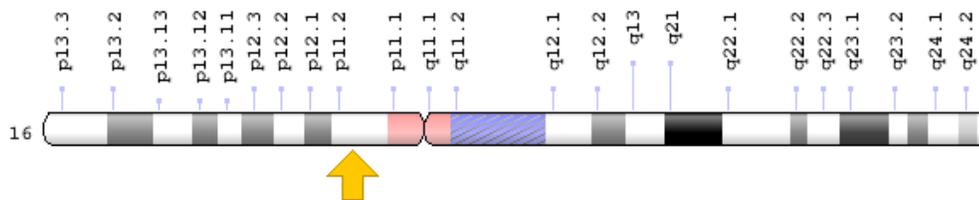


FIGURA 2 | Localización del gen *FUS*. Ubicación citogenética: 16p11.2, que es el brazo corto (p) del cromosoma 16 en la posición 11.2 Localización molecular: 31,179,444 a 31,194,871pb en el cromosoma 16 (Tomado de Genome Decoration Page/NCBI).

4.2 *FUS*, como parte de la familia de proteínas FET

FUS pertenece a la familia de proteínas FET que incluye las ribonucleoproteínas (RBPs) proteína del Sarcoma de Ewing (EWS) y la proteína de unión a la caja TATA asociada al factor 15 (TAF15); estas proteínas son expresadas en la mayoría de los tejidos humanos, y se localizan principalmente en el núcleo celular (Morohoshi *et al.*, 1998). De manera interesante, la proteína *FUS* también se localiza en gránulos

dendríticos y espinas en neuronas donde tienen un papel importante en el transporte del mRNA a dendritas, el cual representa un proceso esencial para la síntesis proteica local y la plasticidad sináptica (Tolino *et al.*, 2012), y que además se ha reconocido como un sello patológico de estos padecimientos neurodegenerativos.

Sin embargo, aún no se ha resuelto si la neurodegeneración es causada por la pérdida de funciones esenciales (pérdida de función) que ya se han sido demostradas por las proteínas FET, y/u otras RBPs, por una ganancia de propiedades tóxicas de estos agregados proteicos (ganancia de función), o por una combinación de ambas (Halliday, 2012), . La pérdida de la función nuclear y el efecto de ganancia tóxica potencial en el citoplasma podría explicar la patogénesis de esta proteína (Shelkownikova *et al.*, 2014).

Por otra parte, estas proteínas de unión a RNA, se encuentran implicadas en procesos celulares que incluyen la regulación de la expresión genética, el mantenimiento de la integridad genómica y el procesamiento de mRNA/microRNA. FUS se caracteriza por presentar distintos dominios (Figura 3): un extremo N-terminal con propiedades de activación transcripcional compuesto por glutamina, glicina, serina y residuos de tirosina, una región rica en glicina, un dominio de unión a DNA, RNA y factores de *splicing* (Law et al, 2006), que se mencionarán a detalle más adelante.



FIGURA 3 | Representación sistemática de los dominios funcionales en FUS.

FUS contiene una parte N terminal rica en glutamina, glicina, serina y residuos de tirosina (SYGQ) que pertenece al dominio de activación transcripcional; dominios de unión a DNA/RNA, tales como, el motivo de reconocimiento de RNA (RRM), repetidos de arginina, glicina, glicina (RGG), un motivo de dedo de zinc (DZ); y una señal de localización nuclear (SLN) en el extremo C terminal rica en PY (prolina-tirosina). (Tomado y modificado de Svetoni *et al.*, 2016).

La proteína del gen *FUS*, en condiciones fisiológicas normales, se transporta del núcleo al citoplasma a través del poro nuclear, y su importe nuclear es asistido por transportina 1 (TRN1), que es responsable de la mayoría del tráfico del transporte nucleo-citoplásmico dentro de la célula. La unión de TRN1 es dependiente del motivo PY (prolina-tirosina) localizado en el extremo terminal carboxílico de *FUS*. La interferencia con esta vía de transporte lleva a la redistribución y reclutamiento de *FUS* en gránulos de estrés. Así, la deslocalización de la proteína *FUS* en casos con DFTL-*FUS* puede corresponder a un defecto general del importe nuclear mediado por transportina (De Jesús-Hernández *et al.*, 2010).

Además, la inhibición de este importe nuclear mediado por transportina resulta en la co-localización de todas las proteínas FET en gránulos de estrés, mientras que las alteraciones en la distribución subcelular de otras cargas de transportina como son la proteína hnRNPA1 (ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1) y la proteína de unión a RNA SAM68 (Src-asociado en mitosis 68 kD) no son afectadas (Svetoni *et al.*, 2016). Estas proteínas se unen a TRN1 a través de secuencias básicas ricas en lisina y arginina que funcionalmente presentan actividad de SEN (señal de exportación nuclear), señal presente en la proteína *FUS*. Estos hallazgos sugieren que las proteínas FET son particularmente sensibles a las alteraciones en esta vía.

Otra posibilidad de esta localización anormal, es que el importe nuclear normal de las proteínas FET es afectado por modificaciones post-transcripcionales anormales que ocurren en una condición de DFT. Al respecto, se ha demostrado que la metilación de la arginina y fosforilación modulan el transporte núcleo-citoplásmico de las proteínas FET, así como la estabilidad y la interacción proteína-proteína. La metilación de arginina de un sitio adyacente al motivo PY hacia el C-terminal perjudica el importe normal de *FUS* mediado por transportina (Dormann *et al.*, 2012). Igualmente, el extremo N-ter de *FUS* contiene un dominio de baja complejidad que puede agregarse en fibrillas, la agregación de *FUS* de este dominio puede ser interrumpida por fosforilación mediada por DNA-PK. Por otra parte, la fosforilación de *FUS* en la tirosina 526, localizada en el exón 15 del gen, por Src cinasa reduce su interacción con TRN1 y puede afectar consecuentemente el transporte de *FUS*

al núcleo. Así, la localización anormal de la proteína FUS resulta en modificaciones post-transcripcionales activadas en el inicio de la DFT (Svetoni *et al.*, 2016).

4.2.1 Variantes génicas relacionadas con FUS

Las variaciones génicas de *FUS* están estrechamente relacionadas a la patogénesis de la DFT, así como en la ELA esporádica y familiar (Vance *et al.*, 2009) y son responsables de este pequeño, pero importante subconjunto de casos. Diversos estudios han reportado 45 mutaciones para este gen. En la tabla 3 se muestra un listado de las variantes reportadas.

TABLA 3 | Lista de mutaciones en FUS, localización presente en DFT y DFT/ELA. Información tomada de la base de datos: <http://www.molgen.vib-ua.be/FTDMutations>

Mutación	Cambio de aminoácido	Exón	Referencias
g.4126G>A	Gly156Glu	EX5	Ticozzi N, 2009
g.4185_4186insGAGGTG	Gly175_Gly176ins; insGG	IVS5	Kwiatkowski TJ Jr, 2009
g.4772G>A	Gly191Ser	EX6	Corrado L, 2010
g.4857C>T	Arg216Cys	EX6	Corrado L, 2010
g.4875G>T	Gly225Val	EX6	Corrado L, 2010
g.4889G>T	Gly230Cys	EX6	Corrado L, 2010
g.4901C>T	Arg234Cys	EX6	Corrado L, 2010
g.4902G>T	Arg234Leu	EX6	Ticozzi N, 2009
g.4931C>T	Arg244Cys	EX6	Kwiatkowski TJ Jr, 2009
g.4961A>G	Met254Val	EX6	Van Langenhove T, 2010
g.10096_10124delins	Ser402_Pro411delinsGGGG	EX12	DeJesus-Hernandez M, 2010
g.10620C>T	Ser462Phe	EX13	Groen EJ, 2010

TABLA 3 | Continuación.

Mutación	Cambio de aminoácido	Exón	Referencias
g.10875G>A	Gly507Asp	EX14	Corrado L, 2010; Hewitt C, 2010
g.10895A>G	Arg514Gly	EX14	Vance C, 2009
g.10895A>G	Arg514Gly	EX14	Vance C, 2009
g.[11185G>T;11186G>T]	Arg514Ser,Gly515Cys	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009
g.[11185G>T;11186G>T]	Arg514Ser,Gly515Cys	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009
g.11194C>G	His517Gln	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009
g.11196G>A	Arg518Lys	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009
g.11204C>G	Arg521Gly	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009; Ticozzi N, 2009
g.11204C>T	Arg521Cys	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009; Ticozzi N, 2009; Vance C, 2009; Belzil VV, 2009; Groen EJ, 2010; Corrado L, 2010; Tateishi T, 2010; Blair IP, 2010; Drepper C, 2011
g.11205G>A	Arg521His	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009; Vance C, 2009; Belzil VV, 2009; Groen EJ, 2010; Van Langenhove T, 2010; Van Damme P, 2010
g.11207A>G	Arg522Gly	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009
g.11213A>T	Arg524Trp	EX15	Hewitt C, 2010
g.11214G>C	Arg524Thr	EX15	Kwiatkowski TJ Jr, 2009

El mecanismo fundamental de patogénesis de mutaciones en FUS está relacionado a un desequilibrio de su localización entre el núcleo y citoplasma ya que incrementan su localización en el citoplasma; estos hallazgos fueron observados por Kwiatkowski en 2009, en muestras de cerebro *post mortem* con ELA. Actualmente, se habla de un nuevo espectro que relaciona la DFT y ELA (DFT/ELA).

Las inclusiones de FUS no solamente se han observado en autopsia de médula espinal y cerebros de casos con ELA. Estas inclusiones también se observan con la presencia de mutaciones en el gen *FUS*, ya que han sido observadas en pacientes con ELA esporádica, ELA familiar ligada a mutaciones en TDP43 y FUS y negativas a SOD1 (Vance *et al.*, 2009).

A pesar de que los diferentes mecanismos moleculares pueden desempeñar un papel en la causa de los trastornos neurodegenerativos, los estudios demuestran una creciente evidencia de anomalías en los procesos de RNA, destacando su papel en la neurodegeneración. Una ganancia de función tóxica del mRNA se ha propuesto para algunas enfermedades neurodegenerativas, mientras que otros trastornos neurodegenerativos son impulsados a través de RNA codificante que se altera o se pierde, así como procesos de *splicing* de RNA y procesos de unión a RNA (Ratti y Buratti, 2016).

Como se mencionó, con la ampliación del conocimiento sobre el impacto de las RBPs en la intervención de procesos de la enfermedad, diversos estudios han mostrado mutaciones en el gen *FUS* en un 5% de casos de DFT/ELA familiar y DFT (Vance, 2009). Esta proteína presenta un papel importante en múltiples etapas de procesamiento y metabolismo del RNA, lo que reafirma que la acumulación patológica de esta proteína haya sido observada en más del 90% de casos con ELA y un 50% en pacientes con DFT (Kwiatkowski, 2009).

Pocos estudios han asociado hasta ahora casos de DFT con mutaciones en FUS. El primer análisis de FUS en pacientes con DFT mostró una mutación sin sentido de *novo* en la región rica en glicina de FUS, la cual se prevé que sea patogénica por un análisis *in silico* (Van Langenhove *et al.*, 2010). Por otra parte, otro estudio encontró una mutación sin sentido de *novo*, en pacientes con el espectro DFT/ELA y uno más en el espectro DFT/ELA/EP (Yan *et al.*, 2010). Más tarde, otro estudio describió dos mutaciones heterocigotas sin sentido en pacientes con DFTvc (Huey *et al.*, 2012), no obstante, estas mutaciones necesitan ser estudiadas en diferentes poblaciones para conocer su distribución y su efecto, puesto que estos estudios únicamente se han realizado en poblaciones europeas.

Independientemente del mecanismo, la deslocalización de la proteína FUS resulta en una reducción de la función nuclear y un aumento de FUS en el citoplasma propenso a la agregación. FUS en el citoplasma, puede resultar en un aumento de la función tóxica, al interrumpir el metabolismo extranuclear del RNA; esto sugiere un papel importante de FUS en las neuronas durante el desarrollo. Por otra parte, también apuntan a una pérdida de función combinada y a la ganancia de función tóxica como el mecanismo patogénico en el espectro DFT/ELA. Igualmente, FUS media el transporte de mRNA dentro y fuera del núcleo, la deslocalización de FUS al citoplasma es presumiblemente la primera etapa en la cascada de fisiopatológica que conduce a la neurodegeneración (Deng *et al.* 2014). Debido a los cambios que provocan las alteraciones en este gen, es de gran importancia conocer las variantes génicas presentes en nuestra población.

4.2.2 Funciones fisiológicas de FUS

FUS se expresa de forma ubicua y en condiciones fisiológicas, como ya se ha mencionado, se localiza predominantemente en el núcleo, aunque puede transportarse entre el núcleo y el citoplasma. Contiene un dominio de activación transcripcional N-terminal, una región rica en Gln-Gly-Ser-Tyr (QGSY); múltiples dominios de unión al DNA, incluyendo un motivo de reconocimiento de RNA y tres regiones ricas en Arg-Gly-Gly (denominados RGG1-3); un motivo dedo de zinc; y una señal de localización nuclear no clásica en el extremo C-terminal altamente conservada que es reconocida por el receptor de transporte nuclear TRN1 (Iko *et al.*, 2004), ver figura 3. Todos estos dominios son requeridos para mediar las interacciones proteína-RNA y proteína-proteína en las múltiples actividades de FUS tanto en nivel transcripcional y post-transcripcional, que se enlistan a continuación.

4.2.2.1 Transcripción de FUS

El gen *FUS* se identificó principalmente en asociación con la translocación genómica de su dominio N-ter a genes de fusión en tumores de liposarcoma y leucemia mieloide, incrementando consecuentemente la transcripción de los genes

quiméricos resultantes. La región rica en QGSY en la región N-ter es responsable por la dimerización y unión a cromatina para la iniciación de la regulación de la transcripción. FUS también regula directamente la actividad de RNA-pol II controlando la fosforilación durante la transcripción. Las mutaciones asociadas a la DFT reducen la unión de FUS a RNA-pol II y la activación de la cromatina (Masuda, 2015; Yang *et al.*, 2014) reduciendo así la regulación de la transcripción.

En este punto es importante destacar, el papel de la región QGSY rica en el dominio del extremo amino terminal (aa 1-239). Éste corresponde a gran parte del exón 5, que se encuentra dentro del dominio de tipo prión, que es esencial y suficiente para la unión de cromatina a FUS. Este dominio en RBPs, como lo es FUS, está implicado en la formación de estructuras dinámicas y reversibles tales como gránulos de extensión y cuerpos de procesamiento. Este dominio describió principalmente a una proteína patológica, que sirve como molde para convertir a la proteína patogénica prion (PrP) en una conformación erróneamente plegada, o mal plegada, para después formar agregados similares a amiloides (Yu y Reed, 2015).

Se ha propuesto que, las moléculas de RNA inician el autoensamblaje de FUS a unión a cromatina. Ese modelo explica la coexistencia de dos pools (ensamblado/ligado a cromatina y soluble) de FUS en el núcleo (Figura 6). En la presencia de moléculas apropiadas de RNA, FUS se ensambla, y se une a cromatina y lleva a cabo su función de regulación en la transcripción y expresión de genes, mientras que en la ausencia de éstas moléculas de RNA, FUS permanece soluble y lleva a cabo otras funciones tales como regulación de *splicing* (Yang *et al.*, 2014). Un estudio previo ha demostrado que RNAs no codificantes incorporan FUS a la cromatina para así, regular la expresión génica (Wang *et al.*, 2008), confirmando el modelo propuesto.

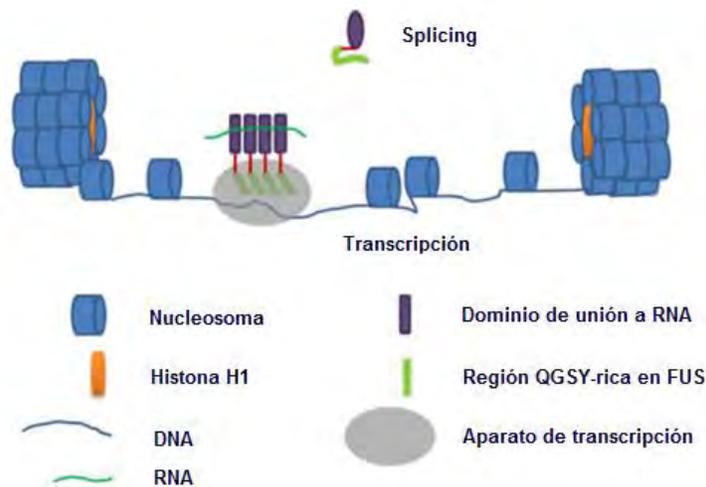


FIGURA 6 | Modelo propuesto del autoensamblaje de FUS y unión a cromatina. La regulación FUS del empalme de mRNA no requiere autoensamblaje o unión a cromatina, por lo tanto, es mediada por el grupo soluble de FUS (Tomado y modificado de Yang *et al*, 2014).

En resumen, el autoensamblaje de FUS y su unión a cromatina en el núcleo en condiciones físicas normales representa un momento crítico para su función normal. La interrupción en este ensamblaje y unión a cromatina, provoca alteraciones en múltiples procesos celulares y finalmente provoca degeneración.

4.2.2.2 *Splicing* pre-mRNA

FUS tiene un papel importante en el *splicing* y la maduración de los RNA, participa directamente en el procesamiento de pre-mRNA y la actividad de *splicing* acoplada a la transcripción. FUS, se une a los pre-mRNA nacientes y actúa como mediador molecular entre la RNA-pol II y el factor U1-snRNP para el *splicing*. FUS controla el procesamiento del transcrito del extremo terminal 3' de la histona durante la fase de replicación S (síntesis) del ciclo celular por medio de la interacción con el aparato transcripcional y el complejo U7 snRNP (Yu y Reed, 2015; Raczynska *et al.*, 2015)

FUS tiene distintos blancos de *splicing*, y la secuencia de unión consenso no está claramente definida, se une de manera preferencial en un modo de dientes de sierra dentro de intrones largos en células neuronales, la proteína mutada cambia su afinidad de unión a RNA (Hoell *et al.*, 2011) como consecuencia de su localización anormal y redistribución en el citoplasma. La significancia de estos eventos de

splicing regulados por FUS debe evaluarse a nivel de proteína para determinar el impacto de las diferentes isoformas generadas en la patogénesis de la enfermedad.

4.2.2.3 Respuesta a daño de DNA

FUS es capaz de promover la formación de D-loop y la recombinación homóloga durante la reparación cuando se da el rompimiento de la doble hebra de DNA (Baechtold *et al.*, 1999). Cuando el daño a DNA es inducido, FUS es fosforilado en los residuos de serina de su extremo N-terminal por dos proteínas cinasas ATM y DNA-PK (Ratti y Buratti, 2016; Wang *et al.*, 2013).

4.2.2.4 Procesamiento de miRNA

La autorregulación de la proteína FUS también está mediada por miRNAs específicos, cuya expresión es inducida por el propio FUS, se unen a la secuencia UTR de FUS en un mecanismo regulador (Modigliani *et al.*, 2014).

FUS fue inicialmente identificado en el complejo Drosha junto con TDP-43, y es capaz a partir de la unión a pri-miRNAs nacientes a enganchar al complejo Drosha a los sitios de cromatina de la transcripción activa para promover el procesamiento de pri-miRNA. En células de neuroblastoma, la depleción de FUS altera la expresión de un número consistente de miRNAs principalmente reduciendo su nivel de regulación, incluyendo a miR-9, miR-125b, y miR-132, que tienen funciones importantes en el metabolismo y diferenciación neuronal. Mientras que la re-expresión de la forma silvestre de FUS es capaz de reponerse de tal alteración, la forma mutada no es tan efectiva debido a la localización reducida en el núcleo y la distribución anormal en el citoplasma (Morlando *et al.*, 2012).

4.2.2.5 Transporte y traducción de mRNA

FUS participa en el transporte de gránulos de RNA en células neuronales hacia dendritas, para regular la traducción local en la sinapsis. En neuronas hipocampales FUS se localiza en las espinas dendríticas sobre mGluR5 de activación y transportando β -actina y el factor estabilizante de actina *Nd1-L* mRNAs, puede

regular la remodelación de médula espinal. FUS está involucrado en el control local de traducción, ya que co-localiza con la proteína que codifica para el gen APC en complejos de RBPs, específicamente en protusiones celulares, y promueve la traducción asociada a mRNAs. La forma mutada de FUS tiene la capacidad de promover activamente la traducción en los granulos-APC positivos. FUS es transportado dentro de las dendritas, no solamente en asociación con microtubulos, sino con filamentos de actina y la miosina de tipo V (molécula que permanece unida al filamento de actina) cuya función es específicamente ordenar los gránulos dentro de las dendritas (Fujii y Takumi, 2005). Recientemente se ha visto que FUS también es transportado a las neuritas terminales por un mecanismo que involucra a los túbulos del retículo endoplásmico y el neurofilamento del citoesqueleto (Ratti y Buratti, 2016).

Estas diversas funciones fisiológicas de FUS, pueden resumirse en la figura 7.

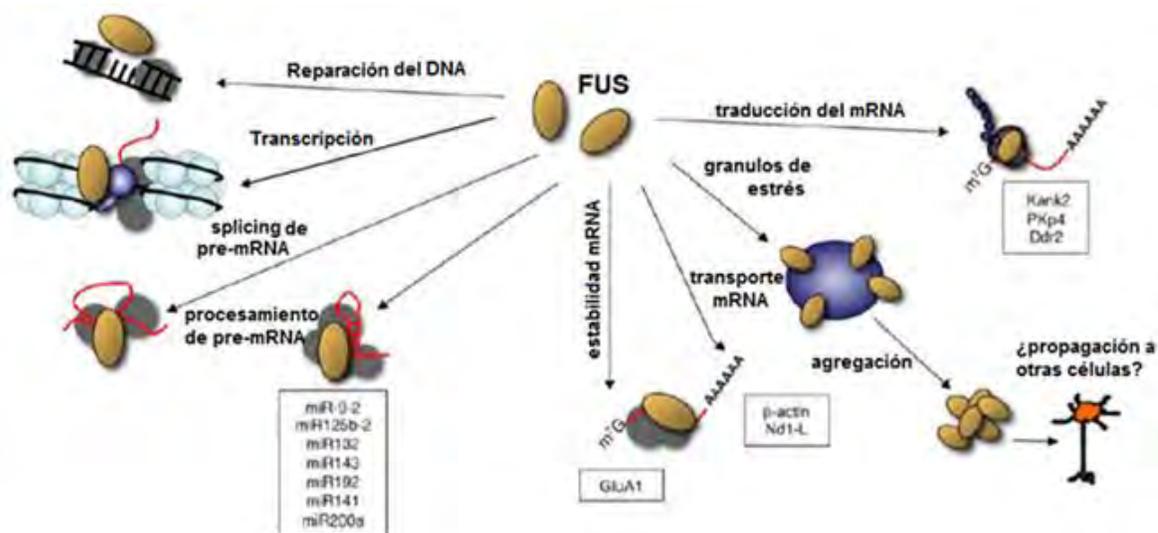


FIGURA 7 | Funciones fisiológicas de *FUS* en la transcripción, como en la post-transcripción. (Tomado y modificado de Ratti y Buratti, 2016).

5. Mecanismo y patología de la DFT

Los mecanismos patogénicos por los cuales FUS causa neurodegeneración aún no son bien definidos. Varios factores están implicados en la toxicidad mediada por

FUS en DFT, incluyendo formación de gránulos de estrés, el dominio prion y la metilación de arginina. La figura 6 muestra el mecanismo patogénico propuesto de de FUS. La forma mutada de la proteína FUS interrumpe la SLN (señal de localización nuclear) y se transporta al citoplasma. El estrés celular induce la expresión de FUS cuyo blanco es el RNA que se incorpora en gránulos de estrés en el citoplasma (Figura 8A). Al disminuir el estrés, los gránulos se disocian, y liberan RNAs, y la proteína vuelve a su función normal nuevamente (Figura 8B). La **transmisión** tipo prión de los agregados de FUS pueden derivar en los distintos fenotipos antes mencionados (Figura 8C).

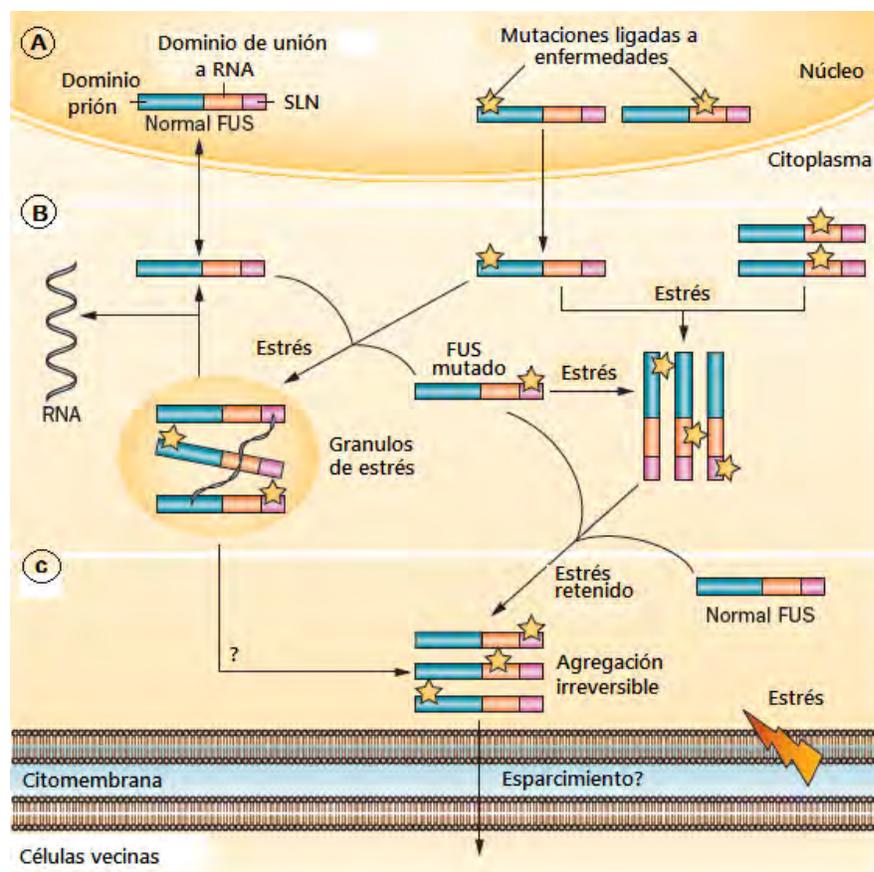


FIGURA 8 | Distribución subcelular, agregación de semillas y transmisión tipo prion de FUS. A) La forma normal de FUS se encuentra dentro del núcleo, la forma mutada de la proteína FUS interrumpe la SLN (señal de localización nuclear) y se transporta al citoplasma. El estrés celular induce la expresión de FUS cuyo blanco es el RNA que se incorpora en gránulos de estrés en el citoplasma. B) Al disminuir el estrés, los gránulos se disocian, liberan RNAs, y la proteína vuelve a su función normal nuevamente. C) La **transmisión** tipo prion de los agregados de FUS pueden derivar en los distintos enfermedades ligadas a mutaciones.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el conocimiento de los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de la DFT ha sido poco estudiado. El diagnóstico basado en el análisis molecular en los genes que participan en estas enfermedades, optimiza la comprensión de estos padecimientos, permitiendo un mejor abordaje clínico y manejo del tratamiento en el paciente. No existen estudios que identifiquen variantes génicas en el gen *FUS* en población latina en pacientes con DFT. Algunos estudios han reportado que las mutaciones en *FUS* pueden ser factor de riesgo de inicio temprano en el espectro de la DFT.

Lo anterior justifica la importancia del reconocimiento en mediano plazo y búsqueda de las variantes génicas en el gen *FUS* en población mexicana, y la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas que disminuyan el impacto de este tipo de padecimientos en la funcionalidad de los pacientes.

1. Hipótesis

La presencia de variantes génicas en el gen *FUS* puede ser causa de DFT, así como la presencia de inclusiones DFT-*FUS*. La presencia de estas variantes en la región codificante de *FUS*, será la causa de DFT en pacientes mexicanos.

Objetivo

General:

Identificar las variantes génicas en los exones 5, 6, 14 y 15 del gen *FUS* en pacientes mestizo mexicanos con demencia frontotemporal.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Metodología

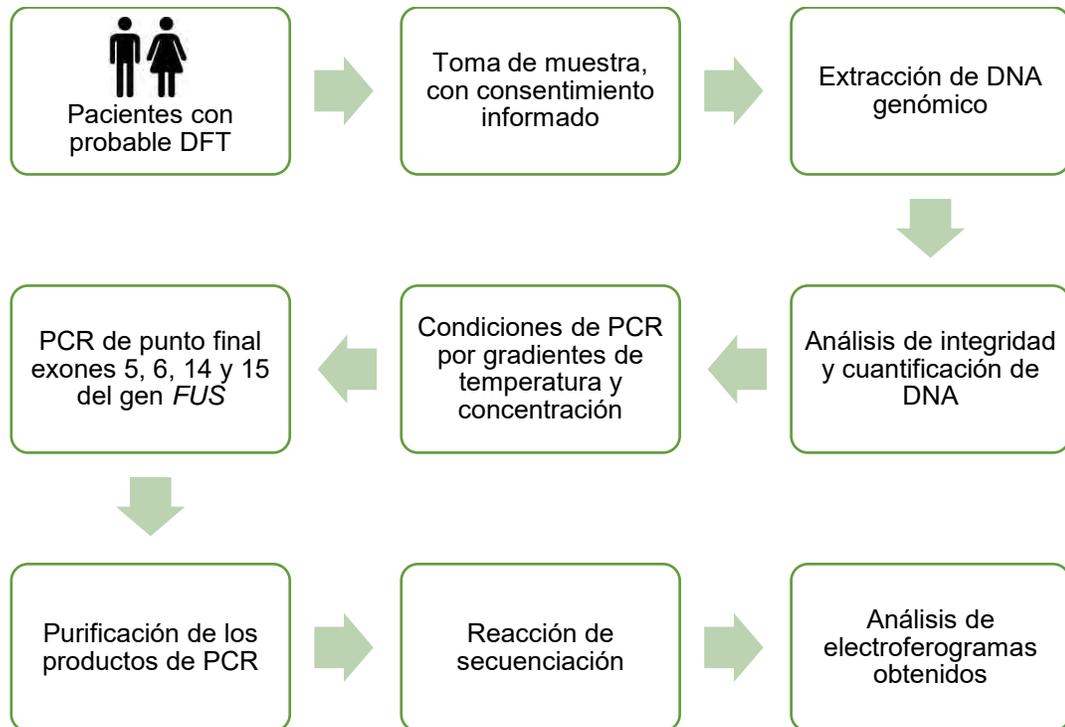


FIGURA 9 | Diagrama general de la metodología utilizada para el análisis del gen *FUS*.

Población de estudio

Se analizaron 52 pacientes mestizo mexicanos con diagnóstico de probable demencia frontotemporal. Todos ellos fueron atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS) y evaluados por neurólogos especializados en Demencias, y firmaron carta de consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética del instituto.

Criterios de inclusión.

1. Pacientes con diagnóstico clínico de demencia frontotemporal, que cumplan con criterios clínicos de probable DFT.

2. Que el paciente acepte participar en el estudio, sea mayor de edad y firme carta de consentimiento informado.
3. Pacientes mestizo mexicanos.

De acuerdo con la definición antropológica, un mestizo mexicano es aquel individuo con tres generaciones nacidas en México, de padres y abuelos nacidos en México; puede aceptarse solamente un abuelo español.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que no cumplan criterios clínicos de probable DFT.
2. Pacientes que no acepten participar en el estudio.
3. Pacientes que no firmen carta de consentimiento informado

Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica

Toma de muestra

Se obtuvo de cada paciente 6mL de sangre periférica mediante venopunción. Las muestras fueron preservadas a 4°C hasta su uso. Se incluyeron muestras de DNA de pacientes con probable DFT pertenecientes al banco de DNA del Depto. de Genética del INNNMVS.

Separación de células mononucleares y extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica, metodología modificada de Miller.

Se extrajo DNA genómico a partir de la muestra de sangre periférica, previo consentimiento informado de pacientes con diagnóstico de probable demencia frontotemporal. La metodología utilizada, descrita por Miller *et al.*, 1988, fue la siguiente:

1. En un tubo para centrifuga de 15mL se transfirieron 3mL de sangre periférica, posteriormente se agregó un volumen de 9mL de una solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR) (*cloruro de amonio 0.155M, bicarbonato de potasio 10mM, EDTA 0.1 m*) y se homogenizó por inversión. Se centrifugó a

3000 revoluciones por minuto durante 6 minutos a 15°C. El sobrenadante se decantó, conservando el botón.

2. Se agregó 1mL de BLGR para resuspender el botón y se transfirió a un tubo con capacidad de 1.5mL. Se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se decantó. Este paso se repitió hasta obtenerse un botón blanco, libre de glóbulos rojos.
3. Al botón se agregó 570µL de una solución de NaCl al 5mM y se homogenizó durante 2 minutos. A continuación, se adicionaron 40µL de una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y se homogenizó por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 µL de una solución de NaCl al 7M y se homogenizó por 10 minutos. Se centrifugó a 11500 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5mL, el botón se desechó.
4. Al sobrenadante se le adicionaron 600µL de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se homogenizó. Se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de 1.5mL.
5. A la fase acuosa obtenida, se le adicionaron 900µL de etanol absoluto frío, esta mezcla se homogenizó y centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó, y al botón se le adicionaron 700µL de etanol al 70%. Se homogenizó y centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón obtenido se secó en un concentrador al vacío durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
6. Finalmente, el botón se resuspendió en 150µL de agua estéril y se mantuvo en agitación a 60°C durante 2 horas, para disolverlo completamente.

Análisis de integridad de DNA

El análisis de integridad se realizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se realizó empleando la siguiente metodología:

1. Se agregó 1 gramo de agarosa en 100mL de buffer de borato sódico (SB) 1x.

2. A esta mezcla se le agregó 1 μ L de Bromuro de etidio (10mg/mL) y se mezcló.
3. Posteriormente, se vertió en un portagel, se colocaron los peines y se dejó solidificar a temperatura ambiente por media hora.

Electroforesis

Para la preparación de la muestra, se depositaron 2 μ L de buffer de carga 10x (azul de bromofenol, glicerol, xilencianol) a 2 μ L de muestra de DNA y se mezcló para ser depositada en un pozo del gel de agarosa. Así mismo, se tomó 1 μ L de marcador de peso molecular Low Range DNA Ladder de 100pb (Thermo Scientific) que se depositó en el gel para comparar el tamaño de la muestra.

Cuantificación de DNA

Se determinó la concentración de DNA genómico total de las muestras mediante espectrofotometría, a una longitud de onda de 260nm. La pureza de las muestras fue determinada por la relación A260/A280. El equipo que se utilizó para determinar estos parámetros fue el nanoDrop2000 (Thermo Scientific).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de los exones 5, 6, 14 y 15 del gen *FUS* se realizó empleando oligonucleótidos específicos, previamente descritos en 2011 por Rademarks, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Los oligonucleótidos se enlistan en la Tabla 4.

TABLA 4 | Secuencias utilizadas para el análisis de los exones 5, 6, 14 y 15 del gen *FUS*.

Fragmento	Dirección	Secuencia
<i>FUS</i> exón 5	sentido	CACGACGTTGTAAAACGACTGTTGGGTACAGAGAATGGACTCCAC
	antisentido	GGATAACAATTTACACAGGAAAATGGGCTGCAGACAAAG
<i>FUS</i> exón 6	sentido	CCTGTCTTGTTCCTAGCTG
	antisentido	GTCACTGCCCCCAAATCAAA
<i>FUS</i> exón 14	sentido	CTCACATGGGTAAGAAAGGCAG
	antisentido	TCCTACCTAACCCAGCGAGTATC
<i>FUS</i> exón 15	sentido	CAGTAGTGGAGAGGGAAGGAA
	antisentido	GACATCGATCTTCCAGGAAAG

Así mismo, fueron estandarizados por un gradiente de temperatura con la finalidad de obtener la temperatura óptima de la amplificación con base en la T_m de cada par de oligonucleótidos, las temperaturas se muestran en la tabla 5.

TABLA 5 | Temperatura óptima de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes a los exones 5, 6, 14 y 15 del gen *FUS*.

Exón	5	6	14	15
T_m (°C)	58	60	60.4	59

Las tablas 6 y 7 muestran los reactivos empleados para la mezcla de la reacción, así como la concentración y el volumen utilizados, para la amplificación se emplearon las enzimas *Hotstar Taq* y *KAPA2G Robust* como se describe en cada tabla respectivamente.

TABLA 6 | Reactivos y concentraciones utilizados en la mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los exones 5 y 6 del gen *FUS*, con la enzima *Hotstar Taq Master Mix*.

Reactivos	Volumen (μL)	Concentración
DNA	2	100ng/ μL
<i>HotStar Taq Master Mix</i>	10	100U/ μL
Primer Forward	1	10 μM
Primer Reverse	1	10 μM
DMSO	1.25	5%
H ₂ O libre de DNAsa (25 μL)	9.75	-

TABLA 7 | Reactivos y concentraciones utilizados en la mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los exones 14 y 15 del gen *FUS*, con la enzima *Kapa 2G Robust*.

Reactivos	Volumen (μL)	Concentración
DNA	2	100ng/ μL
<i>KAPA2G RobustHotStart</i> (100U/ μL)	12.5	-
Primer Forward	1	10 μM
Primer Reverse	1	10 μM
H ₂ O libre de DNAsa (25 μL)	8.8	-

Las condiciones empleadas para la PCR fueron estandarizadas mediante un gradiente de temperatura, para cada exón, obteniéndose resultados óptimos para la amplificación, el programa utilizado para los exones 5 y 6, y los exones 14 y 15, se describen en la Tabla 8 y 9 respectivamente.

TABLA 8 | Programa utilizado para la amplificación de los exones 5 y 6 del gen *FUS* mediante PCR. Varía la temperatura de alineamiento según la Tm de cada oligonucleótido, el programa se repitió por 35 ciclos.

Fase	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	15m	95°C
Desnaturalización	1m	94°C
Hibridación	1m	***
Elongación	1m	72°C
Elongación Final	10m	72°C
Conservación	∞	4°C

} Repetir por 35 ciclos

TABLA 9 | Programa utilizado para la amplificación de los exones 14 y 15 del gen *FUS* mediante PCR. Varía la temperatura de alineamiento según la Tm de cada oligonucleótido, el programa se repitió por 30 ciclos.

Fase	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	3m	95°C
Desnaturalización	15s	95°C
Hibridación	15s	***
Elongación	1m	72°C
Elongación Final	1m	72°C
Conservación	∞	4°C

} Repetir por 30 ciclos

Resolución de los productos de PCR

Para determinar el tamaño de los productos obtenidos de la PCR para cada exón del gen *FUS*, se realizó electroforesis y los productos fueron resueltos en gel de agarosa al 2%/SB 1x.

Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR, se realizó empleando el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®)*, los productos fueron

resueltos en geles de agarosa 2% con buffer SB 1x. La metodología utilizada fue la siguiente:

1. Se agregó un v/v de buffer de unión de membrana y de producto de PCR y se homogenizó.
2. Se insertó una minicolumna SV en un tubo colector.
3. La mezcla que se obtuvo se transfirió en la minicolumna, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.
4. La minicolumna se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto, se desechó la solución que se depositó en el tubo colector.
5. Se agregaron 700µL de buffer de lavado de membrana a la minicolumna SV, el tubo se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto. Nuevamente se desechó la solución del tubo colector y la minicolumna se reinsertó en el tubo colector.
6. Se repitió el paso anterior, agregando 500µL de buffer de lavado de membrana y se centrifugó a 16,000 por 1 minuto.
7. La columna se transfirió a un tubo de 1.5mL
8. Se agregó un volumen de 25µL de agua libre de DNAsas y se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto.
9. La solución final se conservó a 4°C.

Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación, se realizó empleando el kit comercial de secuenciación *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®)*. La mezcla de la reacción utilizada se muestra en la Tabla 10, así como las condiciones empleadas en la Tabla 11.

TABLA 10 | Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Volumen
Producto de PCR		2µL
Buffer	5x	4µL
<i>BigDye Terminator</i>		
<i>V3.1 Cycle</i>		1µL
<i>Sequencing</i>		
Oligonucleótido	10µM	1µL
Agua libre de DNAsas	-	12µL

TABLA 9 | Condiciones de la reacción de secuenciación.

Fase	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	
Desnaturalización inicial	5	94	
Desnaturalización	0.5	94	} Repetir por 25 ciclos
Hibridación	1	55	
Elongación	1	72	
Elongación Final	10	72	
Conservación	∞	4	

Purificación de la reacción de secuenciación

La purificación de los productos de secuenciación se hizo con columnas de purificación *Centri-Sep Spin Columns*, se utilizó la siguiente metodología:

1. Se agregó un volumen de 800µL de agua libre de DNAsas, a una columna *Centri-Sep* para hidratarla. Estas columnas se conservaron a 4°C durante dos horas.
2. Se quitaron las tapas de la columna para drenar el líquido y se colocaron en un tubo colector. Se centrifugó a 3,000 rpm durante dos minutos.
3. Se colocó la columna en un tubo de 1.5mL.

4. El producto de la reacción de secuenciación se adicionó en el centro de la columna y se centrifugó a 3,000 rpm durante 2 minutos.
5. El producto purificado obtenido se secó al vacío.
6. Se rehidrató con 14µL de formamida, para colocarlo en una placa de 96 pozos.
7. Se colocó la placa en un secuenciador [nombre del equipo de Applied B] y se llevó a cabo el análisis.

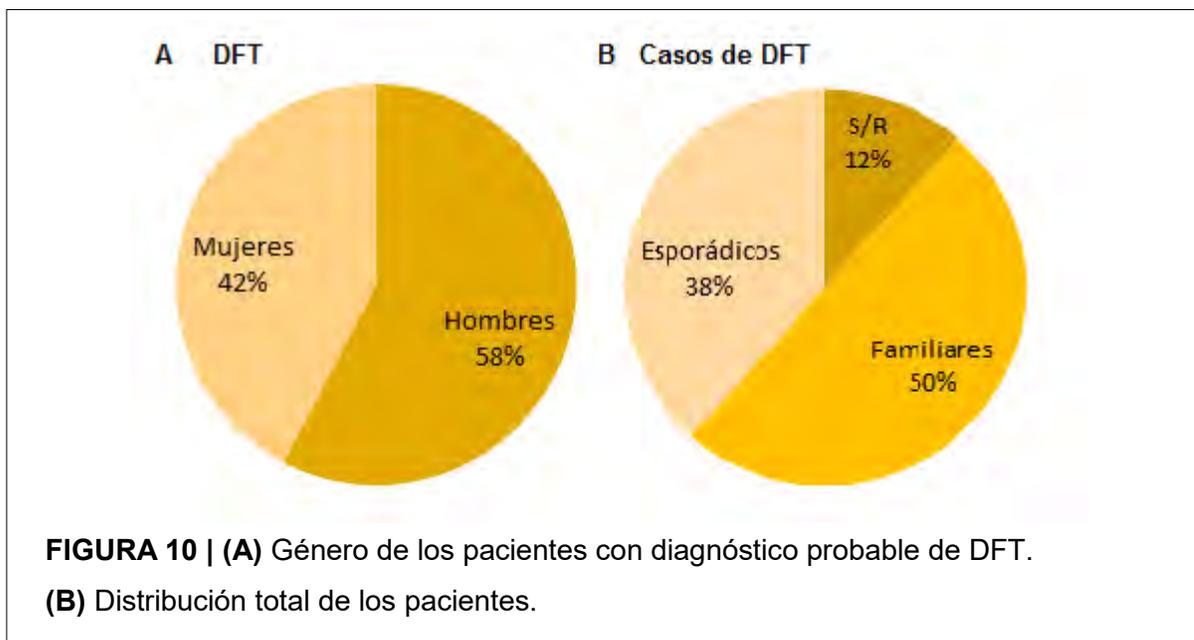
Revisión de electroferogramas

El análisis de los electroferogramas obtenidos se realizó mediante el uso del programa *Sequencing Analysis v5.3*. y el programa *Sequencher 5.1 Gene Codes Corporation*, las secuencias se consultaron en la base de datos de *Ensembl* y *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*.

RESULTADOS

La muestra total estuvo constituida por 52 pacientes con diagnóstico probable de demencia frontotemporal, de los cuales 26 fueron casos familiares (50%), 20 casos esporádicos (38.4%) y un total de 6 pacientes sin especificar patrón de herencia (11.5%).

De ellos, 30 sujetos corresponden a sexo femenino (58%) y 22 a sexo masculino (42%) como se observa en la figura 10A En la figura 10B se muestra que se observó una distribución similar entre hombres y mujeres la edad promedio de la muestra fue de 61.2 años en un rango de 37 a 97 años.



Análisis de integridad y cuantificación de DNA

Con respecto a la cuantificación de DNA, se obtuvo una concentración total promedio de 324.716 ng/ μ L y una pureza total de 1.826 de acuerdo a la relación

A_{260}/A_{280} de las muestras de DNA genómico de los pacientes, que cumple con el rango establecido de calidad y pureza.

Así mismo, se realizó el análisis cualitativo del DNA genómico, mostrando que las muestras de DNA están integras y con un alto peso molecular. En la figura 7 se muestra un gel con los resultados de la electroforesis del DNA, se observa una sola banda, de alto peso molecular comparado con un marcador de peso molecular, las muestras no se mostraron degradadas.

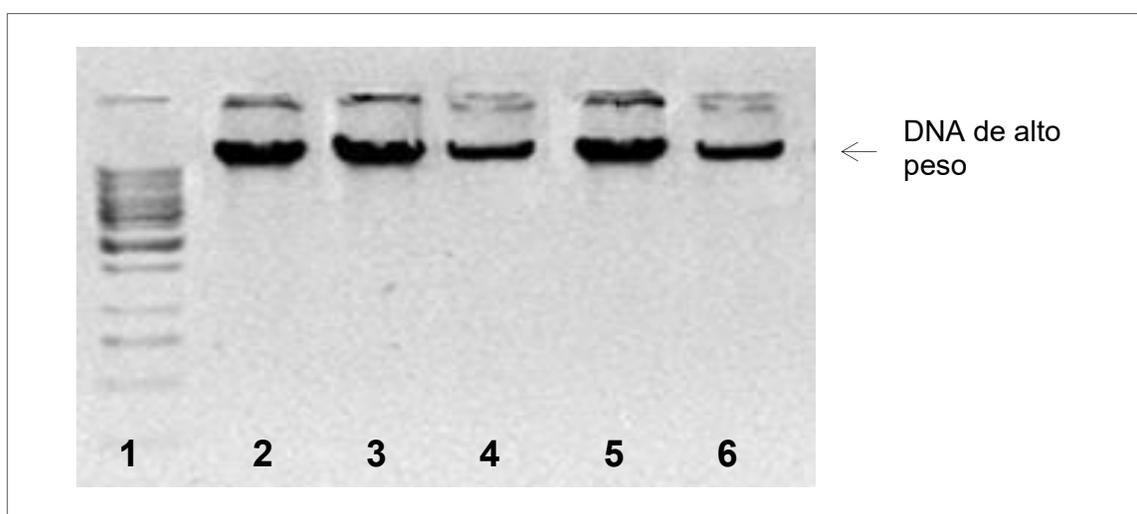


FIGURA 11 | Integridad del DNA genómico en gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (DNA Ladder *GeneRuler* 1Kb), mientras que en los carriles 2-7 se observan muestras diferentes de DNA genómico.

Análisis de los productos de PCR

La amplificación de los exones 5, 6 14 y 15 del gen *FUS* se realizó a partir de DNA genómico con los 8 pares de oligonucleótidos descritos.

Para el análisis del gen *FUS*, los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 2% (figura 8) de cada uno de los exones analizados con la finalidad de comprobar la amplificación, integridad y tamaño de muestra, debido a que las mutaciones que se buscaron son principalmente puntuales, inserciones y

deleciones, por lo que todas las muestras fueron sometidas a secuenciación tipo Sanger.

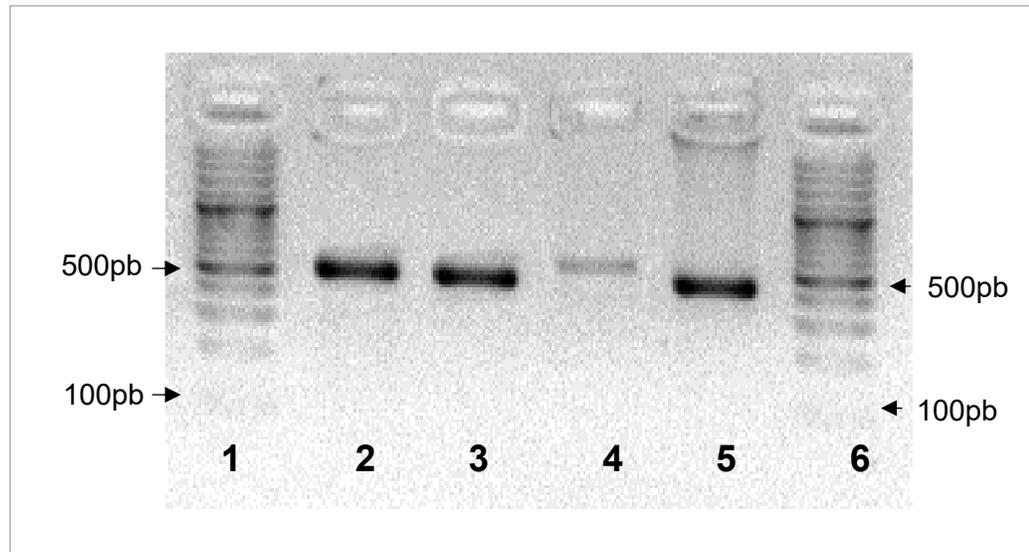


FIGURA 12 | Resolución de productos de PCR de los exones estudiados del gen *FUS*. Gel de agarosa 2.5%. En los carriles 2-5 se muestran las muestras correspondientes a pacientes con DFT de los exones 5, 6, 14 y 15 respectivamente y su número de pares de bases correspondiente, en los carriles 1 y 6 se observa el marcador de peso molecular (*GeneRuler* DNA Ladder 100pb) y el número de pares de bases que corresponden al tamaño estimado de cada exón.

Análisis de electroferogramas

Se amplificaron los exones 5, 6, 14 y 15 ya que contienen el mayor número de mutaciones descritas hasta el momento para la DFT y el espectro ELA/DFT. Las principales mutaciones reportadas y que se buscaron por exón fueron las siguientes: 1) Exón 5, Gly156Glu (Figura 12); 2) Exón 6, Arg216Cys y Met254Val (Figura 21); 3) Exón 14, Gly507Asp y Arg514Gly (Figura 22) y 4) Exón 15, Arg518Lys, Arg521His, Pro525Leu (Figura 23). Sin embargo, en ninguno de los electroferogramas analizados en este trabajo se encontró alguna de las variantes

génicas descritas previamente, tanto en la región codificante de la proteína como en la región intrón-exón que se incluyen en este estudio.

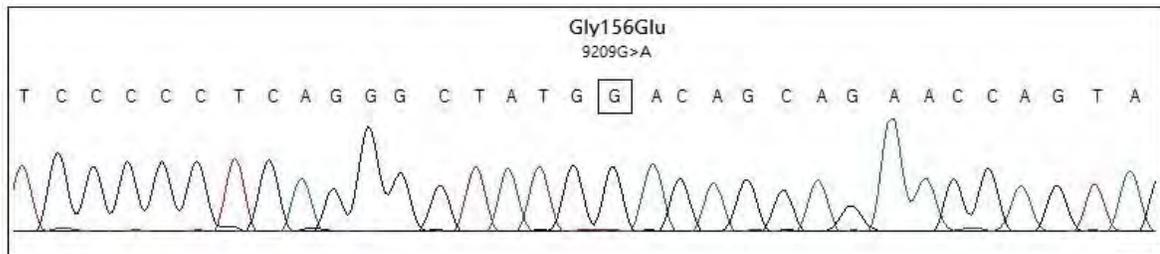


FIGURA 13 | Se muestra electroferograma parcial del exón 5, señalando el sitio donde se ubican las mutaciones buscadas en este exón. Se muestra la localización de la mutación Gly156Glu presente en el espectro de DFT, que deriva en una sustitución de aminoácido.

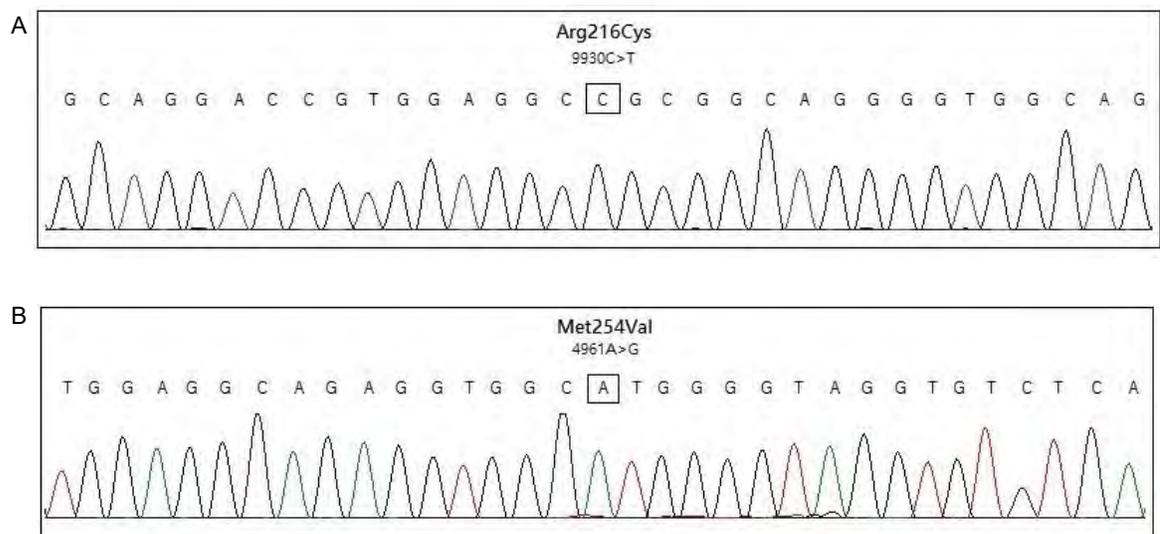


FIGURA 14 | Se muestra electroferograma parcial del exón 6, señalando el sitio donde se ubican las mutaciones buscadas en este exón. A) Se observa la localización de la mutación puntual Arg216Cys presente en el espectro de ELA/DFT y, B) la mutación puntual Met254Val exclusiva de DFT; ambas derivan en una sustitución de aminoácido.

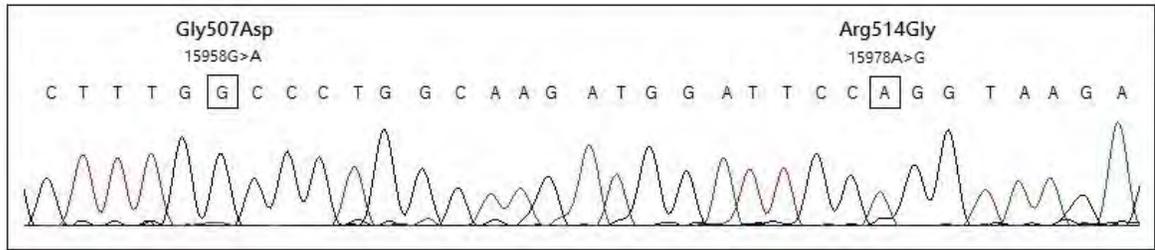


FIGURA 15 | Se muestra electroferograma parcial del exón 14, señalando el sitio donde se ubican las mutaciones buscadas en este exón. Se observan la localización de las mutaciones puntuales Gly507Asp y Arg514Gly, presentes en el espectro ELA/DFT y que derivan en una sustitución de aminoácido.

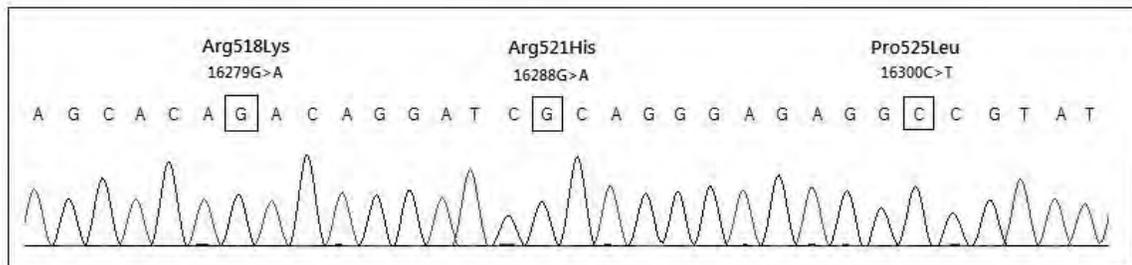


FIGURA 16 | Se muestra electroferograma parcial del exón 15, señalando el sitio donde se ubican las mutaciones buscadas en este exón. Se observan la localización de las mutaciones puntuales que derivan en sustitución de aminoácido: ARG518Lys, Arg521His y Pro525Leu, esta última presente exclusivamente en DFT.

DISCUSIÓN

El descubrimiento de variantes en el gen *FUS*, una de las causas de la DFT y del espectro ELA/DFT abre una ventana para entender la patogénesis de este padecimiento. Estos cambios a nivel de DNA, interfieren con la capacidad funcional, de reparación de DNA y en los mecanismos de *splicing*, que pueden producir al paciente defectos estructurales y funcionales en exones y dendritas e interferir finalmente con la transmisión sináptica.

El presente estudio no identifico alguna variante genética ya sea mutación y/o polimorfismo en los exones en población mestizo mexicana, y al parecer este gen no parece desempeñar un papel relevante en la genética de la DFT a nivel de DNA. Esta investigación constituye un primer acercamiento al estudio del gen *FUS* en este padecimiento en adultos mayores en población mexicana.

Los reconocimientos de las variantes en este gen son de importancia porque se les atribuye una ganancia de función que altera la homeostasis de la proteína *FUS* con su interacción con pre-mRNA, lncRNAs y alteración de la maquinaria de *splicing* así como la respuesta a daño y reparación de DNA (Ling y Cleveland, 2013). Las mutaciones en el gen *FUS* en enfermedades neurodegenerativas son poco frecuentes, y están presentes en un 5% de los casos familiares de ELA, mientras que para la DFT están presentes en un 1% (Vance, *et al.*, 2009), esto puede explicar la ausencia de variantes génicas en los pacientes analizados; son pocas las mutaciones reportadas a nivel mundial ya que hasta el momento se han descrito solamente 45 en las distintas poblaciones estudiadas, las cuales han sido principalmente caucásicas.

En lo que respecta a la naturaleza de la proteína *FUS* como proteína de unión a RNA, las enfermedades asociadas a mutaciones en RBPs normalmente interrumpen la localización nuclear normal de las proteínas mutadas, con el secuestro concomitante de la proteína de tipo *wild type* en agregados citoplasmáticos (Vance *et al*, 2013). Esta SLN se encuentra localizada en el extremo

C Ter que corresponde al exón 15, en este estudio se analizó el exón 14 previo a la SLN y el exón 15 dónde está presente la SLN. El extremo C Ter contiene el dominio de unión a RNA, sitio donde se localizan los exones 14 y 15 del gen mismos que fueron analizados en este estudio. La mayoría de las variantes reportadas interrumpen la localización de señalización nuclear que se sugiere está ligada fuertemente a un mecanismo de pérdida de función por formación de inclusiones citoplásmicas. La ausencia de mutaciones y/o polimorfismos en esta región, podría indicar que la patología de la DFT se debe a otros mecanismos, de manera que deberá determinarse si existen variantes en los exones restantes, para establecer la participación de este gen en la DFT y su intervención con otros genes, así como complementar este tipo de estudios con hallazgos histopatológicos.

Desde otro punto de vista, se conoce la gran heterogeneidad clínica de los síntomas en los casos con DFT y del solapamiento de los mismos en el espectro ELA/DFT que se complementa también a nivel histopatológico ya sea con inclusiones intracelulares compuestas de la proteína tau (50%), las proteínas ubiquitinadas como TDP-43 (5-10%) y con menor frecuencia FUS (<10%). Aún en la ausencia de mutaciones, las inclusiones citoplásmicas anormales de TDP-43 representan una característica patológica de las formas esporádicas de ELA y la DFT (Neumann et al., 2006). Similarmente, la localización nuclear de FUS y los agregados citoplásmicos se encuentran en pacientes con DFT sin patología de TDP-43, lo que sugiere que este número de pacientes deberían ser evaluados en otros genes involucrados en la enfermedad, como lo es *TARDBP* que codifica para la proteína TDP-43, y así descartar una patología con inclusiones en TDP-43, así como tener en cuenta la presencia de otros genes mutados como se mencionó anteriormente.

Asimismo, la familia FET de proteínas tiene un papel importante en las inclusiones patológicas características, como un tipo particular de DFT-FUS, pero no en ELA-FUS. Sin embargo, en todos los casos reportado de ELA que presentan inclusiones en FUS, las mutaciones en el gen *FUS* causan la enfermedad mientras que sólo un grupo pequeño de casos de DFT con inclusiones en FUS presentan mutaciones en *FUS*.

Por otra parte, las RBPs de varias familias de proteínas con funciones aun no definidas en *splicing*, han ganado recientemente un gran interés y actualmente han sido implicadas como reguladores clave de *splicing*. El factor de *splicing* de FUS, aún no ha sido bien caracterizado, pero se sabe que FUS está implicado en transcripción, *splicing* y transporte de mRNA, reparo de DNA, y proliferación celular (Deng, 2014); a pesar de ello, no se encontraron cambios en las regiones de unión intrón-exón en dónde se ubican los sitios de *splicing*.

En igual forma, un análisis de la ontología del gen de todos los blancos de *splicing* de FUS, entre ellos MAPT, unánimemente sugieren su participación en el crecimiento axonal y la organización del citoesqueleto, lo cual es consistente con la morfología alterada de las espinas dendríticas y el crecimiento de los conos axonales reportados sobre la pérdida de FUS, sin embargo esto se tiene que confirmar, así como los cambios mediados por FUS en el *splicing* alternativo, y en aquellos blancos de *splicing*, presentes en pacientes con esta patología

Ya que aproximadamente el 80% de empalme se produce de manera co-transcripcional (Fredericks, *et al.*, 2015), la interacción entre la activación de la polimerasa II (Pol II) y la unión a RNA hace de FUS un candidato interesante como factor modificador de *splicing*, lo que no excluye el estudio de las regiones no codificantes de la proteína. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se propone la realización de estudios a nivel de proteína y RNA, ya que la atención se debe centrar en el estudio de la regulación génica.

Aunque no se encontraron casos positivos, no debe ser descartada la intervención del gen para un futuro análisis molecular. Al ser un primer abordaje de la búsqueda de mutaciones para FUS, es importante considerar el análisis completo del gen para esclarecer los mecanismos de patogénesis y su participación tanto en la DFT como en el espectro de DFT-ELA puesto que en este estudio solamente se consideraron los *hot spots* en FUS, aquellos sitios en donde recaen un mayor número de las mutaciones reportadas para estas patologías; es importante considerar a este espectro porque se trata de patologías completamente distintas en las que este gen juega un papel importante en la patogénesis las mismas.

La falta de mutaciones y de polimorfismos en los exones 5, 6, 14 y 15 del gen *FUS*, resulta contrario a lo previamente reportado en otras poblaciones, principalmente población caucásica, dónde la incidencia de variantes génicas está presente como es el caso de la población belga (Lagenhove, 2010); esto habla de otro factor importante a considerar como es el origen de la población mexicana y la composición genética, los cuales deben ser considerados en este tipo de estudios, ya que acuerdo al estudio de Silva y colaboradores en 2009, dónde los resultados de dicho estudio mostraron que el promedio de ancestría indígena entre los individuos muestreados es de 53%, mientras que 42 % de su genoma y el restante 5 % son de origen europeo y africano, respectivamente. Por lo tanto, la ausencia de variantes génicas sugiere que pueden estar asociadas al origen genético propio de la población que las presente. La importancia del diagnóstico de la DFT en distintas etnias se debe realizar debido a la alta tasa de recombinación entre poblaciones, y a que las diferentes poblaciones están expuestas a distintos factores de selección natural de acuerdo a su localización, ya sea que se encuentren en América, o en otras latitudes.

A pesar de las diferencias étnicas observadas en prevalencia e incidencia en deterioro cognitivo, en la DFT y la EA, los estudios han destacado que la población de origen americano e hispano presenta altos niveles de prevalencia e incidencia de estas patologías en población caucásica (Mayeux y Mayeux, 2004). Crear descendencia con individuos fuera del radio geográfico trae cambios en las frecuencias genéticas de la población local o incluso crea nuevas poblaciones. Esto sugiere fuertemente que, en el medio ambiente de América, el flujo de genes entre pueblos anteriormente distintos geográficamente, ha sido multidireccional, que influyen en la estructura/composición subsecuente de cada grupo, y por lo tanto en la incidencia o no de mutaciones o polimorfismos en las distintas poblaciones.

Hay muchas causas de demencia, por el momento los factores ambientales implicados son poco conocidos y controversiales. Aunque la etiología exacta no puede ser determinada de manera definitiva al inicio de la enfermedad o después de la muerte si no se realiza autopsia. A pesar de que existen criterios de diagnóstico

para la EA y la DFT, la evolución del paciente, los estudios de imagen y los estudios moleculares son de gran importancia para el diagnóstico definitivo. Se ha demostrado que la determinación histopatológica resultado de la autopsia tiene una exactitud del 90%. No obstante, aún son pocos los estudios de autopsia que se realizan para confirmar estos diagnósticos.

Particularmente, una probable causa de la ausencia de variantes génicas, puede ser la dificultad del diagnóstico clínico, ya que se deja completamente al clínico determinar si es o no un cuadro de DFT, y este diagnóstico siempre se basa en el dominio del experto clínico (Knopman y Roberts, 2011). Por lo que se demandan acciones específicas, tales como fortalecer el conocimiento de las demencias, tanto de la parte molecular cómo clínica, para poder ofrecer un diagnóstico mejor e implementar el tratamiento de las mismas a nivel clínico. Grandes avances se han llevado a cabo en los últimos años en genética, bioquímica y neuropatología de la DFT, que complementan en gran parte el diagnóstico clínico, lo que extiende el conocimiento de esta enfermedad y en un factor encontrar un tratamiento eficiente para ella.

Finalmente, estos hallazgos podrían apoyar nuevos descubrimientos relacionados a la DFT con características genéticas que la ubiquen dentro de un espectro con características diferentes, ya que el no haber encontrado alguna variante, no anula la posibilidad de que existan otras mutaciones en los exones no analizados en este estudio que podrían considerar otro tipo de variantes como son duplicaciones o deleciones completas del gen, por lo que habría que realizar estudios de dosis génica. Estos resultados cambian el rumbo del abordaje genético del estudio de la DFT en población mexicana, con el fin de tener más y mejores diagnósticos que permitan brindar asesoría genética oportuna, y para estimar el impacto de las posibles variantes que no están siendo presentes a nivel de DNA. Así como la presencia de otros genes aún no identificados, que coloque a nuestros sujetos de estudio dentro de otro análisis molecular. Sin embargo, también se requieren de estudios con un mayor número de casos que nos permita compararlos con otras poblaciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con los datos aportados por el resto de la comunidad científica, contribuirán al avance del conocimiento de los factores genéticos que hay detrás del desarrollo de la DFT, aunque aún resta conocer con exactitud los mecanismos, y otros genes que estén implicados en el desarrollo de la DFT en población mexicana. La importancia de conocer las demencias, nos permitiría a futuro la creación de biomarcadores genéticos de predisposición a esta enfermedad.

Es necesaria una mayor profundización en la arquitectura genética de esta patología que ayude a elucidar los mecanismos moleculares de la enfermedad que contribuyan a la mejora en el diagnóstico y sean candidatos para nuevas dianas terapéuticas, así como la identificación de nuevos marcadores genéticos asociados a la susceptibilidad de la DFT, un trastorno neurodegenerativo que constituye un problema de salud pública a nivel mundial.

CONCLUSIONES

El presente estudio no identificó alguna variante genética ya sea mutación y/o polimorfismo en los exones analizados en 52 pacientes con diagnóstico probable de DFT en población mestizo mexicana, y al parecer este gen no parece desempeñar un papel relevante en la genética de la DFT a nivel de DNA.

En este estudio no se identificaron mutaciones ni polimorfismos, en las secuencias de los exones analizadas en los 52 pacientes con diagnóstico de probable DFT.

En los pacientes analizados, no se descarta la posibilidad de la presencia de otros genes asociados a la DFT y estos resultados pueden orientar el posterior análisis y participación del gen *FUS* en pacientes mexicanos.

PERSPECTIVAS

Los resultados finales, sugieren cambiar el nivel de investigación, comenzando con:

- La realización de estudios funcionales y de expresión en *FUS*.
- El análisis a nivel de proteína, a partir de RT-PCR.

El análisis del gen *FUS* completo, así como el estudio de otros genes implicados en la DFT, entre ellos: *C9Orf72*, *TDP-43* y los genes que codifican para el resto de las proteínas FET.

Para mejorar el conocimiento generado por los estudios genéticos, se requiere estudiar un mayor número de casos, para otorgar mayor rigor estadístico a los análisis, lo que permitiría llevar a cabo una correlación genotipo-fenotipo para realizar un diagnóstico más preciso y temprano.

REFERENCIAS

1. Agudelo, Y., Solís, R., Acosta, I., García, N., De la Torre, G., Sosa, A. (2011). Síntomas neuropsiquiátricos en adultos mayores con y sin demencia de regiones urbana y rural. Resultados del Grupo de Investigación en Demencia 10/66 en México. *Revista de Investigación Clínica*, 63(4): 382-390.
2. Asociación Mundial de Alzheimer. *World Alzheimer Report 2015*. (2015) The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. [Disponible en: <https://www.alz.co.uk/sites/default/files/img/world-alzheimer-report-2015.pdf>]
3. Baechtold, H., Kuroda, M., Sok, J., Ron, D., Lopez, B., Akhmedov, A. (1999). Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *Journal of Biological Chemistry*, 26;274(48): 34337-34342.
4. Chan, D., Reutens, S., Liu, D., Chan, R. (2011). Frontotemporal Dementia: Features, diagnosis and management. *Australian Family Physician*, 40(12), 968-972.
5. Chiadi, U., Onyike, M., y Diehl-Schmid, M. (2013). The Epidemiology of Frontotemporal Dementia. *International Review of Psychiatry*, 25(2): 130–137.
6. DeJesus-Hernandez, M., Kocerha, J., Finch, N., Crook, R., Baker, M., Desaro, P., Johnston, M., Rutherford, N., Wojtas, A., Kennelly, K., Wszolek, Z., Graff-Radford, N., Boylan, K., y Rademakers, R. (2010). De novo truncating FUS gene mutation as a cause of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human Mutations*, 31(5): 1377-1389.
7. Deng H, Gao K, Jankovic J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*. 10(6): 337-348
8. Doherty, C., Hutchinson, S., Abrahams, S. y Coen, R. (2011). Frontotemporal Dementia. En: O. Hardiman and C. Doherty, eds., *Neurodegenerative Disorders*, Springer Science & Bussines Media, pp.115-142.

9. Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M., Mackenzie, I., Capell, A., Schmid, A., Neumann, M., y Haass, C. (2010). ALS-associated fused in sarcoma (*FUS*) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 29, 2841–2857.
10. Dormann D., Madl T., Valori C., Bentmann E., Tahirovic S., Abou-Ajram C., Kremmer E., Ansorge O., Mackenzie I., Neumann M., y Haass, C. (2012). Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 31(22): 4258-4275.
11. Fabre, S., Forsell C., Viitanen, M., Sjögren, M., Wallin, A., Blennow, K., Blomberg, M., Andersen, C., Wahlund, L., Lannfelt, L. (2001). Clinic-based cases with frontotemporal dementia show increased cerebrospinal fluid tau and high apolipoprotein E ϵ 4 frequency, but no tau gene mutations. *Experimental Neurology*, 168 (2), 413-418.
12. Ferrari, R., Thumma, A., y Momeni, P. (2013). Molecular Genetics of Frontotemporal Dementia. En: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
13. Ferrari, R., Hernandez, D., Nalls, M., Rohrer, J., Ramasamy, A., Momeni, P., *et al.* Frontotemporal dementia and its subtypes: a genome-wide association study. *The Lancet Neurology*, 13, 686-699.
14. Ferrari, R., Forabosco, P., Vandrovcova, J., Botía, J., Guelfi, S., Warren, J., Momeni, P., Weale, M., Ryten, M., Hardy, J. (2016). Frontotemporal dementia: insights into the biological underpinnings of disease through gene co-expression network analysis. *Molecular Neurodegeneration*, 11(21).
15. Fredericks, A., Cygan, K., Brown, B., y Fairbrother, W. (2015). RNA-Binding Proteins: Splicing Factors and Disease. *Biomolecules*, 5(2): 893–909.
16. Fujii, R. y Takumi, T. (2005). TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *Journal of Cell science*, 15;118(24): 5755-5765.

17. Goedert, M., Ghetti, B., y Spillantini, M. (2012). Frontotemporal Dementia: Implications for Understanding Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
18. Halliday, G., Bigio, E., Cairns, N., Neumann, M., Mackenzie, I., Mann, D. (2012). Mechanisms of disease in frontotemporal lobar degeneration: gain of function versus loss of function effects. *Acta Neuropathologica*, 124, 373-382.
19. Hodges, J., Patterson, K. (2007). Semantic dementia: a unique clinicopathological syndrome. *The Lancet Neurology*, 6,1004-1014.
20. Hoell, J., Larsson, E., Runge, S., Nusbaum, J. Duggimpudi, S., Farazi, T., Hafner, M., Borkhardt, A., Sander, C., Tuschl, T. (2011). RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13; 18(12): 1428-31.
21. Huey E., Ferrari R., Moreno J., Jensen C., Morris C., Potocnik F., Kalaria R., Tierney M., Wassermann E., Hardy J., Grafman J., Momeni P. (2012). FUS and TDP43 genetic variability in FTD and CBS. *Neurobiology of Aging*, 33,1-16.
22. Iko, Y. *et al.* (2004). Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS. *J. Biol. Chem.* 279, 44834–44840.
23. Josephs, K., Holton, J., Rossor, M., Godbolt, A., Ozawa, T., Strand, K., Khan, N., Sarraj, S., Revesz, T. (2004). Frontotemporal lobar degeneration and ubiquitin immunohistochemistry. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30, 369-373.
24. Knopman, D., y Roberts, R. (2011). Estimating the Number of Persons with Frontotemporal Lobar Degeneration in the US Population. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 45(3), 330-335.
25. Kwiatkowski, T., Bosco, D., Leclerc, A., Tamrazian, E., Vanderburg, C., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G., Hosler, B., Cortelli, P., de Jong, P., Yoshinaga, Y., Haines, J., Pericak-Vance, M., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., Kenna-Yasek, D., Sapp, P., Horvitz, H., Landers, J., Brown, R. (2009). Mutations in the *FUS/TLS* gene on

- chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 323(42), 1205–8.
26. Lashley, T., Roheret, J., Mead, S., y Revesz, T. (2015). Review: an update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(7), 858-81.
 27. Law, W. J., Cann, K. L., and Hicks, G. G. (2006). TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression. *Briefing in Functional Genomics and Proteomics Journal*, 5, 8–14.
 28. Ling, S., Polymenidou, M., Cleveland, D. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 79(3), 416-38.
 29. Mackenzie, I., Baborie, A., Pickering-Brown, S., Du, P., Jaros, E., Perry, R., Neary, D., Snowden, J., Mann, D. (2006). Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype. *Acta Neuropathologica*, 112, 539-549.
 30. Mackenzie, I., Neumann, M., Bigio, E., Cairns, N., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I., Ince, P., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D., Trojanowski, J., Mann, D. (2010). Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathologica*, 119, 1-4.
 31. Masuda A., Takeda J., Okuno T., Okamoto T., Ohkawara B., Ito M., Ishigaki S., Sobue G., Ohno K. (2015). Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes & Development*, 29(10): 1045-1057.
 32. Mayeux, J and Mayeux R. (2004). Ethnic differences in dementia and Alzheimer's disease. En N. Anderson, Bulatao, R., Cohen, C. *Critical perspectives on racial and ethnic differences in health in late life*. USA: National Academic Press.
 33. McKhann, G., Albert, M., Grossman, M., Miller, B., Dickson, D., Trojanowski, J. (2001). Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia:

- report of the Work Group in Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Archives of Neurology*, 58, 1803-1809.
34. Mercy, L., Hodges, J., Dawson, K., Barker, R., Brayne, C. (2008). Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology*, 71, 1496-1499.
 35. Miller S., Dykes and H., Polesky H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3): 1215.
 36. Modigliani, D., Morlando, M., Errichelli, L., Sabatelli, M., Bozzoni, I. (2014). An ALS-associated mutation in the FUS 3'-UTR disrupts a microRNA-FUS regulatory circuitry. *Nature Communications*, 9;5: 4335.
 37. Morlando M., Modigliani, D., Torrelli, G., Rosa, A., Di Carlo, V., Caffarelli, E., Bozzoni, I. (2012). FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 31, 4502-4510.
 38. Morohoshi, F., Ootsuka, Y., Arai, K., Ichikawa, H., Mitani, S., Munakata, N., Ohki, M. (1998). Genomic structure of the human RBP/hTAFII68 and FUS/LS genes. *Gene*, 121(2), 191-198.
 39. National Center of Biotechnology Information. Nucleotide Database. [Disponibile en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].
 40. Neumann, M., Sampathu, D., Kwong, L., Truax, A., Micsenyi, M., Chou, T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C., McCluskey, L., Miller, B., Masliah, E., Mackenzie, I., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H., Trojanowski, J., Lee, V.(2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 6;314(5796): 130-133.
 41. Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretschmar, H., Mackenzie, I. (2009). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain*, 132, 2922–2931.

42. Ostrosky, F. Madrazo, I., Vélez, A. (2008). Demencia Frontotemporal: Estudio Neuropsicológico y Neuroradiológico de un Caso. *Revista Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias*, 8(1), 127-139.
43. Ostrosky, F. y Lozano, A. (2012). Demencia Frontotemporal: Una Revisión. *Revista de Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias*, 12(1), 189-202.
44. Raczynska, K., Ruepp, M., Brzek, A., Reber, S., Romeo, V., Rindlisbacher, B., Heller, M., Szwejkowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., Schümperli, D. (2015). FUS/TLS contributes to replication-dependent histone gene expression by interaction with U7 snRNPs and histone-specific transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 43(20): 9711-9728
45. Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., Hodges, J. (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*, 58, 1615-1621.
46. Ratti, A. y Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *Journal of Neurochemistry*, 1: 95-111.
47. Rohrer, J., Guerreiro, R., Vandrovцова, J., Uphill, J., Reiman, D., Beck, J., Isaacs, A., Authier, A., Ferrari, R., Fox, N., Mackenzie, I., Warren, J., de Silva, R., Holton, J., Revesz, T., Hardy, J., Mead, S., Rossor, M. (2009). The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*, 73, 1451–1456.
48. Rohrer, J., Warren, J. (2011). Phenotypic signatures of genetic frontotemporal dementia. *Current Opinion in Neurology*, 24, 542–549.
49. Rosso, S. M., Landweer, E. J., Houterman, M., Donker Kaat, L., van Duijn, C. M., van Swieten, J. C. (2003). Medical and environmental risk factors for sporadic frontotemporal dementia: A retrospective case–control study. *Journal of Neurology and Neurosurgery, Psychiatry*, 74, 1574-1576.
50. Seelaar H, Kamphorst W, Rosso SM, Azmani A, Masdjedi R, de Koning I, Maat-Kievit JA, Anar B, Donker Kaat L, Breedveld GJ, et al. (2008). Distinct genetic forms of frontotemporal dementia. *Neurology*, 71, 1220-1226.
51. Shelkownikova T., Robinson, H., Southcombe, J., Ninkina, N., Buchman, V. (2014). Multistep process of FUS aggregation in the cell cytoplasm involves

- RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 23(19): 5211-5226.
51. Svetoni F., Frisone P., y Paronetto, M. (2016). Role of FET proteins in neurodegenerative disorders, *RNA Biology*, 13(11), 1089-1102.
 52. Tolino, M., KCohrmann, M., Kiebler, M. (2012). RNA-binding proteins involved in RNA localization and their implications in neuronal diseases. *European Journal of Neuroscience*, 35, 1818-1836.
 53. Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Bellerocche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 323, 1208–1211.
 54. Wang, W., Pan, L., Su, S., Quinn, E., Sasaki, M., Jimenez, J., Mackenzie, I., Huang, E., Tsai, L. (2013). Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nature Neuroscience*. 10: 1383-1391.
 55. Warren, D. J. (2013). Frontotemporal dementia: Clinical review. *British Medical Journal*, 374, 4827.
 56. Yan, J., Deng, H., Siddique, N., Fecto, F., Chen, W., Yang, Y., Liu, E., Donkervoort, S., Zheng, J., Shi, Y., Ahmeti, K., Brooks, B., Engel, W., Siddique, T. (2010). Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology*, 75, 807–814.
 57. Yang, L., Gal, J., Chen, J. and Zhu, H. (2014). Self -assembled FUS binds active chromatin and regulates gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 111, 17809-1714.
 58. Yu, Y., y Reed, R. (2015). FUS functions in coupling transcription to splicing by mediating an interaction between RNAP II and U1 snRNP. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 112, 8608-8613.